

Aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung
an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. Leidl

Akrosinbestimmung bei Bullenspermien unter besonderer Berücksichtigung des einzelnen Spermiums

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Volker Wendt
aus Heilbronn

München 1974

Aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung
an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. Leidl

Akrosinbestimmung bei Bullenspermien unter besonderer Berücksichtigung des einzelnen Spermiums

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Volker Wendt
aus Heilbronn

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Professor Dr. E. Dahme

Referent: Professor Dr. W. Leidl

Korreferent: Professor Dr. P. Walter

Tag der Promotion: 26. Juli 1974





Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Das Akrosom	2
2.1.1. Entstehung und Ultrastruktur	2
2.1.2. Akrosom und Kapazitation	3
2.1.3. Akrosomale Enzyme	5
2.2. Akrosin	9
2.2.1. Indirekte Nachweisverfahren	9
2.2.1.1. Extraktionsverfahren und Isolierung	9
2.2.1.2. Substratspezifität	11
2.2.2. Direkte Nachweismethoden	13
2.2.2.1. Qualitativ	13
2.2.2.2. Quantitativ	14
2.2.3. Biochemische Eigenschaften von Akrosin	17
2.2.4. Akrosininhibitoren	18
2.2.5. Akrosin und Befruchtung	21
2.2.6. Verhalten des akrosomalen Systems unter in vivo und in vitro Bedingungen	23
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	28
3.1. Versuchstiere und Versuchsanordnung	28
3.1.1. Gruppeneinteilung	28
3.1.2. Gewinnung und Untersuchung der Ejakulate	29
3.1.3. Lagerung der Ejakulate	30

	Seite
3.2. Methoden	31
3.2.1. Photometrische Akrosinbestimmung	31
3.2.1.1. Gewinnung der Akrosomenextrakte	31
3.2.1.2. Quantitative photometrische Akrosinbestimmung	31
3.2.1.3. Eigene Voruntersuchungen zur photometrischen Akrosinbestimmung	33
3.2.2. Akrosinbestimmung auf Gelatinefilmplatten	34
3.2.2.1. Vorbereitung der autoradiographischen Platten	35
3.2.2.2. Übertragen der Filmmembranen auf Objektträger	35
3.2.2.3. Inkubation der Ejakulate und Gelatinesubstratfilme	36
3.2.2.4. Auftragen der Spermien auf den Substratfilm	36
3.2.2.5. Auswertung der Lysiszonen	38
3.2.2.6. Überprüfung der Spezifität der Gelatinesubstratfilm-Methode	38
3.3. Ergebnisse	39
3.3.1. Statistische Auswertung (Überblick)	39
3.3.2. Abhängigkeit der extrahierbaren Akrosinaktivität vom pH-Wert und der Extraktionsdauer	41
3.3.3. Gelatineproteolyse von Bullenspermien	41
3.3.3.1. Vorversuche zur Methodik	41
3.3.3.2. Ablauf der Lysisreaktion bei Bullenspermien auf Gelatinesubstratfilmen	46
3.3.3.3. Vergleich der Lysisflächen von gewaschenen und ungewaschenen Bullenspermien auf Gelatinemembranen	48
3.3.3.4. Überprüfung der Akrosinspezifität auf Gelatine	48
3.3.4. Deckbeanspruchung und Akrosinaktivität	52
3.3.4.1. Auswirkungen unterschiedlicher Ejakulationsfrequenz auf die Akrosinaktivität der Spermienpopulation/Ejakulat	52

	Seite
3.3.4.2. Auswirkungen unterschiedlicher Ejakulationsfrequenz auf die Gelatineproteolyse einzelner Spermien von Bullenejakulaten	55
3.3.5. Spermienmorphologie und Akrosinaktivität	57
3.3.6. Korrelation zwischen Akrosinaktivität und Gelatineproteolyse von Bullenspermien	61
3.3.7. Akrosinaktivität nach Lagerung der Bullenspermien bei +4°C bzw. -20°C	66
3.3.8. Lysisfläche einzelner Spermatozoen auf Gelatine nach Lagerung der Ejakulate bei +4°C bzw. -20°C	72
4. DISKUSSION	76
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
6. LITERATURVERZEICHNIS	96
LEBENS LAUF	119

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren sind aus dem Akrosom von Säugetierspermien zahlreiche Enzyme extrahiert worden, die bei der Spermienpenetration in das Ei eine wesentliche Rolle spielen. Vor allem die akrosomale Protease Akrosin hat sich als Schlüsselenzym bei der Befruchtung erwiesen. Sie wurde inzwischen aus Menschen- und Eberspermien biochemisch rein isoliert.

Die bisherigen Untersuchungen galten überwiegend der physiologisch-funktionellen Bedeutung von Akrosin. Die Lokalisation im Akrosom, seine Aufgabe bei der Befruchtung und das in jüngster Zeit entwickelte Nachweisverfahren im Einzelejakulat, legen es jedoch nahe, die enzymatische Bestimmung von Akrosin im klinisch-diagnostischen Bereich anzuwenden.

Die Akrosomen von Bullenspermien reagieren äußerst empfindlich auf Veränderungen ihres physiologischen Milieus. Alterationen des akrosomalen Systems, wie sie beispielsweise durch tiefe, unphysiologische Temperaturen in vitro oder nach längerem Aufenthalt der Samenzellen im Nebenhoden auftreten können, sind allerdings mit den üblichen, morphologischen Untersuchungsmethoden nicht immer einwandfrei zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, inwieweit sich Schädigungen der Akrosomen auf die Akrosinaktivität von Bullenspermien auswirken. Als Parameter wurde sowohl die Enzymmenge der Spermienpopulation als auch die proteolytische Aktivität einzelner Spermatozoen benutzt.

2. LITERATUR

2.1. Das Akrosom

2.1.1. Entstehung und Ultrastruktur

Im Verlauf der Spermatogenese wandern die proakrosomalen Granula der jungen Spermatide mit dem Golgiapparat zum vorderen Pol des Zellkerns, verschmelzen dort und breiten sich schließlich um den apikalen Kernteil aus (DOTT und DINGLE, 1968). Auf diese Weise entsteht eine kappenähnliche Struktur, die in ihrer Gesamtheit als Akrosom bezeichnet wird. Nach neueren Untersuchungen stellt das Akrosom die membranbegrenzte Kopfkappe und ihren Inhalt dar (Abb. 1). Kopfkappe und Akrosom sind daher identisch (MANN, 1964; NICANDER und BANE, 1966). Man unterscheidet einen Spitzenteil, der dem vorderen Kernteil aufliegt, ein Hauptstück, das sich auf den hinteren Kernteil erstreckt, und ein abgesetztes Äquatorialsegment, welches den caudalen Kappenteil einengt. Die Verbindung des Hauptstückes mit dem Äquatorialsegment ist durch eine abrupte Dickenabnahme der Akrosomenmembran sowie durch eine Dichtezunahme des Akrosomeninhalts gekennzeichnet (FAWCETT, 1970). SACKS und ALMQUIST (1966) sehen im Äquatorialsegment ein Artefakt ejakulierter Spermien. Nach ihrer Ansicht ist dieser Bereich von der degenerativen Anschwellung der Akrosomenmembranen nicht betroffen. Dadurch entsteht eine unphysiologische Form. NICANDER und BANE (1966) beobachteten diesen Akrosomenabschnitt bei fast allen Spermien epididymaler Herkunft. Bei Affen- und Menschenpermien scheint das Segment nicht vorhanden zu sein (ERICSSON und BUTHALA, 1970).

Der subakrosomale Raum wird von einer äußeren und inneren Akrosomenmembran umschlossen. Er enthält eine lysosomale Enzymausstattung (ALLISON, 1967) und ist mit amorphem, anfärbbarem Material gefüllt (MANN, 1964; NICANDER und BANE, 1966; ALLISON und HARTREE, 1969).

Im Bereich der inneren, akrosomalen Membran wurde bei elektronenmikroskopischer Untersuchung von Spermien eine parakristalline Komponente gefunden, die vermutlich ein für die Auflösung der Zona pellucida wesentliches Enzym enthält (FAWCETT, 1970; FRANKLIN und Mitarbeiter, 1970; KOEHLER, 1972).

Die äußere Akrosomenmembran ist zusätzlich von einer Plasmamembran bedeckt, die das gesamte Spermium umhüllt. Ihre Kondensationsfähigkeit gegen physikalische oder chemische Bedingungen variiert von Spezies zu Spezies. Die Membranen von Bullenspermien haben sich als besonders stabil erwiesen (JONES, 1973 a).

2.1. Akrosom und Kapazitation

Seit langem ist bekannt, daß zwischen dem Aufenthalt der Spermien im weiblichen Genitaltrakt und ihrer Befruchtungsfähigkeit ein funktioneller Zusammenhang besteht (BEDFORD, 1970 a). Bei vielen Spezies, unter anderem auch beim Rind, können frisch ejakulierte Spermien die Eihüllen erst nach einem physiologischen Reifungsprozeß durchdringen: Sie werden kapazitiert (AUSTIN, 1969). Hierbei wirken das umgebende Milieu der uterinen und tubalen Sekrete sowie Substanzen der Eihüllen stimulierend (GWATKIN und Mitarbeiter, 1973; JOHNSON und Mitarbeiter, 1972; FRASER und Mitarbeiter, 1971; MIYAMOTO und CHANG, 1972; PAVLOK und McLAREN, 1972; HARTMANN und GWATKIN, 1971; LEWIS und KETCHEL, 1971). Da an kapazitierten Spermien aus Uterus und Eileiter keinerlei strukturelle Veränderungen festgestellt werden konnten, die morphologischen Zusammenhang mit der Kapazitation zeigten, ist die physiologische Bedeutung dieses Prozesses noch unklar. Offensichtlich können die Eihüllen jedoch nur von Spermien durchdrungen werden, die sich längere Zeit im weiblichen Genitaltrakt befanden. CHANG und YANAGIMACHI (1963) verbinden die Kapazitation daher mit physiologischen Änderungen, die Spermien zur Durchdringung der Eihüllen befähigen. ZANEVELD und Mitarbeiter (1971 a) sind der Meinung, daß es während des

Reifungsprozesses zur Demaskierung akrosomaler, eihüllenauf-
lösender Enzyme kommt. Nach AUSTIN (1969) wird im Verlauf
der Kapazitation die Akrosomenreaktion, eine Vesikulation
von Plasma- und äußerer Akrosomenmembran, entblockt. Dadurch
gelingt es dem Spermium mit Hilfe lytischer Enzyme, die Ei-
hüllen zu durchdringen. Kapazitation und Akrosomenreaktion
sind, nach Ansicht des Autors, als einheitlicher Prozeß an-
zusehen.

Das Phänomen der Akrosomenreaktion wurde von BEDFORD (1966,
1970 a, 1970 b) ausführlich beschrieben: Fast alle Säuge-
tierspermen verlieren kurz vor Durchdringung der Zona pel-
licida das Akrosom. Diese "echte" Akrosomenreaktion beginnt mit
einer fortschreitenden Auflösung der Plasma- und äußeren
Akrosomenmembran, welche verschmelzen unter Bildung, wodurch eine lose Hülle um den apikalen Kopfteil entsteht.
Im Bereich des Äquatorialsegments löst sich das Akrosom
schließlich ab, wobei die Grundform meist erhalten bleibt
(FRANKLIN und Mitarbeiter, 1970). Die innere Akrosomenmem-
bran wird zur Überhülle des Spermiums, das Äquatori-
alsegment bildet damit ERICSSON und BUTHALA, 1970; NICANDER
und SÄNDEL 1971; KRAMANN, 1971; JONES, 1973 b; YANAGIMACHI
und NODA, 1972 a).

Von der "echten" Akrosomenreaktion, die immer in unmittelba-
rer Nähe des Eies abläuft, unterscheidet BEDFORD (1970 a)
eine "falsche" Akrosomenreaktion. Sie tritt als degenerative
Erscheinung bei nicht kapazitierten Spermien auf und ist
durch eine vollständige Lösung der Plasmamembran gekennzeich-
net (FRANKLIN und Mitarbeiter, 1970). JONES (1973 b) konnte
sie bei etwa 5% der epididymalen Eberspermien nachweisen.

Für die Spermienkapazitation in vivo und in
vitro müssen bestimmte Voraussetzungen gegeben sein. Eine
wesentliche Rolle spielen hierbei die Kapazitationsmedien
bzw. der endokrine Status des weiblichen Tieres. ERICSSON
(1969) konnte die Spermienkapazitation in vivo untersuchen.
Er benutzte hierzu fluoreszenzmarkierte, ejakulierte Bullen-
spermien. Bei weiblichen Rindern, die im Östrus standen, war
nach 5-stündigem Aufenthalt der Spermien im Uterus keine

Fluoreszenz mehr festzustellen. Dagegen blieben bei Tieren im Anöstrus die Spermatozoen angefärbt. VAIDYA und Mitarbeiter (1969) bestätigen diese Ergebnisse beim Kaninchen.

Die Spermienkapazitation in vitro gelingt mit zahlreichen Inkubationsmedien in relativ großen pH-Bereichen und osmotischen Druckunterschieden (EDWARDS, 1972; YANAGIMACHI, 1972 b). Dabei werden die Spermien für die Akrosomenreaktion "konditioniert" (EDWARDS, 1972). Bei der Inkubation von Nebenhodenspermien in Kapazitationslösungen zeigte sich nämlich, daß sie viel früher die Eihüllen in vitro penetrieren, als unbehandelte Samenzellen.

Einige der künstlichen Kapazitationsmedien haben große Ähnlichkeit mit Substanzen, die von den Eihüllen selbst synthetisiert werden. Wurde die Cumulusschicht von Hamstereiern entfernt, so war die Befruchtungsrates mit epididymalen Spermien um 50% geringer als bei Eihüllen mit intakten Granulosazellen (GWATKIN und Mitarbeiter, 1972; MIYAMOTO und CHANG, 1972; PAVLOK und McLAREN, 1972). Damit schien bewiesen, daß zumindest die äußeren Eihüllen (Cumulus oophorus, Corona radiata) eine Kapazitation bzw. Akrosomenreaktion induzieren. FRASER und Mitarbeiter (1971) halten dies jedoch für unwahrscheinlich.

Aus den bisher vorliegenden Veröffentlichungen ist zu entnehmen, daß die Kapazitation von Säugetierspermien mit physiologischen Vorgängen verbunden ist, die im Verlauf der Akrosomenreaktion zur Ablösung akrosomaler, eihüllenauflösender Enzyme führen, welche in 2.1.3. näher charakterisiert werden.

2.1.3. Akrosomale Enzyme

Die lysosomale Enzymausstattung der Akrosomen weist darauf hin, daß sie Lysosomenabkömmlinge sind oder lysosomenähnliche Struktur haben (ALLISON, 1967; TEICHMAN und BERNSTEIN, 1969).

Neben saurer Phosphatase (TEICHMAN und BERNSTEIN, 1971; YANAGIMACHI und TEICHMAN, 1972), saurer Protease, β -Glucuronidase, Ribonuclease, Desoxyribonuclease und Glucosaminidase, die

unter anderem auch in den zytoplasmatischen Tröpfchen der Spermien vorkommen (DOTT und DINGLE, 1968), sind im Akrosom folgende Enzyme lokalisiert: Hyaluronidase (ZANEVELD und POLAKOSKI, 1973 a; LEWIS und KETCHEL, 1971), ein Corona penetrating enzyme (CPE) (ZANEVELD und WILLIAMS, 1970 b), eine Spermienneuraminidase (FRITZ und Mitarbeiter, 1971) und eine trypsinähnliche Protease, das Akrosin oder trypsin like enzyme (TLE) (FINK und Mitarbeiter, 1972 a; FRITZ und Mitarbeiter, 1971; GARNER und Mitarbeiter, 1971; HO und MEIZEL, 1970; MEIZEL, 1972; MULTAMÄKI und NIEMI, 1969; POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972 a).

STAMBAUGH und BUCKLEY (1969) gelang es, Hyaluronidase und Akrosin als Komplex aus dem Akrosom von Kaninchenspermien zu isolieren. Er setzte sich im wesentlichen aus Lipoglykoproteinen zusammen und löste bei in vitro Versuchen die Zona pellucida auf. Dabei ging die Hauptwirkung von Akrosin aus. Kristalline Hyaluronidase (pharmazeutisches Präparat) hatte nur Einfluß auf die Cumuluszellen. Da diese hauptsächlich aus Mucopolysacchariden bestehen und Hyaluronidase diese Großmoleküle in kleinere Bruchstücke zerlegen kann, ist die Aktivität des Enzyms wahrscheinlich auf diese Zellschicht beschränkt (YANAGIMACHI, 1972 b; MANN, 1964). ZANEVELD und Mitarbeiter (1971 a) konnten Hyaluronidase aus Bullen- und Kaninchenspermien annähernd rein gewinnen und nachweisen, daß sich die lysosomale, aus anderen Körperzellen, und testikuläre (akrosomale) Hyaluronidase biochemisch unterscheiden. Ihrer Ansicht nach wirken die ebenfalls im Akrosom vorkommenden N-acetyl-glucosaminidasen bzw. β -Glucoronidasen synergistisch bei der Auflösung des Cumulus oophorus durch Spermienhyaluronidase.

Das Corona penetrating enzyme (CPE) wurde aus Akrosomenextrakten von Kaninchen- und Menschengpermien isoliert (ZANEVELD und WILLIAMS, 1970 b). CPE wirkte ausschließlich auf die Corona des Eies. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß die Spermien durch die interzelluläre Substanz, nicht durch die Coronazellen selbst eindringen. Der Angriffspunkt des Enzyms dürfte deshalb das

Zwischenzellmaterial sein. Die hitzelabile Proteinkomponente des Extrakts wird durch einen Faktor (DF = Dekapazitationsfaktor) des Seminalplasmas gehemmt (BHALLA und Mitarbeiter, 1972; CHANG, 1957; WILLIAMS und Mitarbeiter, 1969). Dieser Inhibitor wird offensichtlich bei der Spermienkapazitation im weiblichen Genitaltrakt von der Samenzelle abgelöst und das CPE kann im Verlauf der Akrosomenreaktion auf die Eihüllen einwirken. Neuraminidase unterstützt diese Funktion. Sie wird ebenfalls durch den DF gehemmt (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1970 a).

1935 gewann YAMANE (1935 a, 1935 b) einen "Samenextrakt" aus epididymalen Kaninchenspermatozoen, der nach Einwirkung auf die Follikelzellmasse zur Ablösung der Eihüllen führte, erkannte aber die spezifische Wirkung des Akrosin auf die Zona pellucida noch nicht. Die Substanzen des Extraktes waren thermolabil und bei pH 7,7 aktiv. Er nahm an, daß die Spermien mit Hilfe dieser "Tryptasen" auf das Eizytoplasma einwirken können und dadurch befruchtungsfähig sind. Eine genauere Charakterisierung gelang 1966 WALDSCHMIDT und Mitarbeitern, die im Bullensperma ein spermieeigenes, trypsinähnliches Enzym fanden. Wurden die Samenzellen gewaschen, so erhöhte sich die Aktivität. Durch den Waschvorgang wurde wahrscheinlich ein "aus kontaminierenden Sekreten stammender Hemmstoff entfernt". Die Autoren dachten an eine "Bedeutung der tryptischen Enzyme für die Spermien beim Vordringen zur Eizelle". STAMBAUGH und BUCKLEY (1968) extrahierten 1968 aus Kaninchenspermienköpfen einen Enzymkomplex, der die Zona pellucida auflöste, ohne die vitelline Membran anzugreifen. Die proteolytische Komponente des Komplexes konnte mit Lima- und Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor gehemmt werden. In ihrem pH-Optimum und ihrer Substratspezifität unterschied sie sich kaum von kristallinem Trypsin.

Später gelang den Autoren der Lokalisationsnachweis (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1969): Das hydrolytische, trypsinähnliche Enzym war an das Akrosom der Spermien gebunden. Es konnte als einfaches Molekül fraktioniert werden. Man nahm an, daß diese Protease mit der inneren Akrosomenmembran in

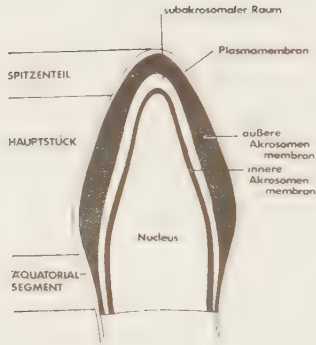


Abb. 1: Schematische Darstellung des Akrosoms von Bullenspermien. Im Bereich des Äquatorialsegments ist die abrupte Dickenabnahme der äußeren Akrosomenmembran auffallend.



Abb. 2: Die eihüllenauflösenden, akrosomalen Spermienenzyme (schematische Übersicht).
Modifiziert nach FRITZ und Mitarbeitern, 1971

Zusammenhang stehen oder ein Teil der Membranstruktur selbst sein mußte (FAWCETT, 1970; KOEHLER, 1972; STAMBAUGH und BUCKLEY, 1969), da die äußere Membran vor Erreichen der Zona pellucida bereits abgelöst wird. Akrosin wirkt demnach erst nach der Akrosomenreaktion bzw. Kapazitation auf die Eihülle ein. Vermutlich liegt es schon vor bzw. nach der Kapazitation in aktiver Form vor, wird aber von Inhibitoren der Vesikulardrüsensekrete reversibel gehemmt (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1972). Eine direkte Beteiligung des Enzyms beim Kapazitationsprozeß im weiblichen Genitaltrakt erschien daher unwahrscheinlich.

Der von STAMBAUGH und BUCKLEY (1968) für das Enzym vorgeschlagene Name "Akrozonase" wurde später durch den Begriff "Akrosin" ersetzt (SCHUMACHER und Mitarbeiter, 1971).

2.2. Akrosin

2.2.1. Indirekte Nachweisverfahren

2.2.1.1. Extraktionsverfahren und Isolierung

Durch verschiedene Extraktionsverfahren versuchte man den akrosomalen Inhalt aus den Spermatozoen herauszulösen. HATHEWAY und HARTREE (1963) gelang es, die Akrosomen von Schaf- und Bullenspermien durch mechanische Manipulation (Schütteln der Spermis sedimente mit Glasperlen) abzulösen und ihren Inhalt mit alkalischen Lösungen zu extrahieren. Das angefärbte Akrosomenmaterial (Färbung: Ortho-perjod-säure-Schiff's-Reagenz = PAS) war nach Extraktion mit 0,0125 n NaOH nur noch im Bereich des Äquatorialssegments nachzuweisen. Zusätzliche Behandlung mit 1,5 mM CTAB (Cetyltrimethyl-ammonium-bromid) führte zur Ablösung der gesamten Membranstruktur. Im Akrosomenextrakt wurden Hyaluronidase, Kohlehydrate und stickstoffhaltige Substanzen gefunden.

Nach dieser Methode orientierten sich zunächst die von anderen Wissenschaftlern entwickelten Verfahren der gezielten

Akrosinextraktion: Die gewaschenen, sedimentierten Spermien wurden mit schwach basischen, detergentienhaltigen (Hyamin, Triton X-100) Pufferlösungen (pH 7,5) und Glasperlen behandelt (HO und MEIZEL, 1970; POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972 a; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a; BERNSTEIN und TEICHMAN, 1973; MULTAMAKI und MIKKO, 1972; PEDERSEN, 1972; PRAKASH und SRIVASTAVA, 1972; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 b). Auch durch Tiefgefrieren ejakulierter, gewaschener Spermien in flüssigem Stickstoff bzw. Auftauen bei Raumtemperatur wurde versucht, Akrosin aus der Kopfkappe herauszulösen (PEDERSEN, 1972). In jedem Fall konnten allerdings nur geringe Enzymaktivitäten mit diesen Methoden aus ejakulierten Säugetierspermien extrahiert werden.

POLAKOSKI und Mitarbeiter (1972 b) sowie ZANEVELD und Mitarbeiter (1973 c) stellten fest, daß aus epididymalen Spermien oder nach Reinigung der Extrakte ejakulierter Samen-zellen über Molekularsiebe (Sephadex, DEAE-Zellulose = Diäthylaminoäthyl) wesentlich höhere Aktivitäten ermittelt werden konnten. Enzymsätze im alkalischen Bereich waren nicht stabil.

Es stellte sich heraus, daß Akrosin frischejakulierter Spermien mit Seminalplasmainhibitoren einen reversiblen Komplex bildet, der erst in saurer Lösung dissoziiert (FINK und Mitarbeiter, 1972 a; FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a). FINK und Mitarbeiter (1972 a) extrahierten daraufhin die Akrosomen ejakulierter Eberspermien mit 2%iger Essigsäure (pH 2,6 - 1,8) und erhielten um 30 - 40% höhere Akrosinausbeuten als bei Verwendung pufferhaltiger Detergentien. Mit ihrer Extraktionsmethode wurden etwa 95 Prozent der gesamten Akrosinaktivität der Spermien erfaßt. Offensichtlich wurden die Akrosomenmembranen im sauren Medium rasch und vollständig durchlässig bzw. das Akrosin, sofern es an die Membranen gebunden war, völlig abgelöst. Bei Verwendung geeigneter Substrate genügten daher geringe Enzymkonzentrationen zum Nachweis.

Große Spermamengen, wie sie bisher zur Akrosinextraktion

mit Detergentien benutzt wurden, waren nicht mehr notwendig. Die Akrosinaktivität konnte nun auch im Einzelejakulat bestimmt werden (SCHILL, 1973 a).

2.2.1.2. Substratspezifität

Nachdem die enge Verwandtschaft von Akrosin und Pankreas-trypsin bewiesen war (FRITZ und Mitarbeiter, 1971; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a), wurden für photometrische Nachweismethoden hauptsächlich synthetische Trypsinsubstrate verwendet (SCHIESSLER und Mitarbeiter, 1972). Sie zeichnen sich durch ein ähnliches Reaktionsoptimum bei pH 8,0 und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Akrosin aus. In einem bestimmten photometrischen Meßbereich (10 Minuten bei 405-366 nm) werden sie proportional zur eingesetzten Akrosinmenge gespalten. Die Spaltungsgeschwindigkeit wird dabei indirekt gemessen (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a). Von FRITZ und Mitarbeitern (1972 a) und anderen (GARNER und Mitarbeiter, 1971; HO und MEIZEL, 1970; MEIZEL, 1972; POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972 a; SCHILL, 1973 a; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a; MULTAMÄKI und MIKKO, 1972) wurden folgende Akrosinsubstrate benutzt:

- BAPA (N-alpha-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid)
- BLNA (N-alpha-Benzoyl-L-lysin-nitroanilid)
- BAEE (N-alpha-Benzoyl-arginin-äthylester)
- TAME (N-Tosyl-L-arginin-äthylester)
- BANA (Alpha-Benzoyl-DL-arginin-ß-naphtylamid-hydrochlorid)
- AME (L-Arginin-methylester)

Als besonders empfindliches Substrat für Akrosin erwies sich BAEE. Es wird sowohl im einfachen als auch, mit Coenzymen, im kombinierten Testsystem angewendet. Unter bestimmten Testbedingungen (BERGMAYER, 1970; FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a) wird dieser Ester 36 mal schneller hydrolysiert als BAPA. Die Umsatzrate pro Mol Akrosin beträgt 8×10^9 μ Mol BAEE/min. Daher ist BAEE für die Aktivitätsbestimmung am Einzelejakulat gut geeignet.

Bei niedrigen, molaren Akrosinkonzentrationen besteht die Gefahr, daß ein großer Prozentsatz der Akrosinaktivität durch Adsorption an Glasoberflächen verloren geht (POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972 a). Daher sind FRITZ und Mitarbeiter (1972 a) der Ansicht, daß die von anderen Autoren (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 b) beobachtete Akrosinaktivierung in Gegenwart von Metallionen nur durch eine Verminderung dieses Effektes bedingt sei. Bei allen Manipulationen empfiehlt sich deshalb die Verwendung von Plastik- bzw. silikonisierten Glasgeräten (SCHIESSLER und Mitarbeiter, 1972).

SCHILL (1973 a) untersuchte eingehend das Verhalten der akrosomalen Protease unter den Bedingungen des kombinierten BAEE/ADH (Alkoholdehydrogenase)-Testsystems. Im Prinzip erfolgen dabei zwei enzymatische Schritte: Akrosin aus essigsauren Spermienextrakten spaltet das trypsinspezifische Substrat BAEE. Dabei wird Äthanol frei und bildet mit Hilfe des Coenzym Nicotinamid-dinucleotid (NAD^+) Nicotinamid-dinucleotid-Wasserstoff (NADH), das bei 366 nm photometrisch bestimmt wird. Für diesen indirekten Enzymtest wurden 0,05 ml des Akrosomenextraktes eingesetzt. Die Fehlerbreite des Gesamtverfahrens betrug $\pm 7\%$. Die Extraktionsdauer der Spermiesedimente hatte keinen Einfluß auf die extrahierbare Akrosinaktivität. Wurden die Spermien vor der Behandlung mit Essigsäure (pH 2,4) mehrmals gewaschen, so kam es zu einem stetigen Verlust an Akrosin. Wahrscheinlich wurde das reichlich an Inhibitoren des Seminalplasmas gebundene Enzym durch den Waschvorgang entfernt. Bei manchen Ejakulaten stieg die proteolytische Aktivität nach wiederholter Suspension in physiologischer Kochsalzlösung allerdings über 100 Prozent an. Dies kann einerseits auf Alterationen im Bereich der akrosomalen Membranen zurückgeführt werden, wodurch das Enzym bei essigsaurer Extraktion besser erfaßt wird; andererseits ist an die Aktivierung eines bisher nicht bekannten Proenzym zu denken (SCHILL, 1973 a).

2.2.2. Direkte Nachweismethoden

2.2.2.1. Qualitativ

Akrosine sind analog zu Trypsin Endoproteinasen (SCHIESLER und Mitarbeiter, 1972). Sie wirken proteolytisch auf Casein, Hämoglobin, Ribonuclein und Gelatine (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a; MULTAMÄKI und MIKKO, 1972; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 b). Vor allem Gelatine wird häufig als heterogenes Substrat für verschiedene Proteasen benutzt (BERGSTRÖM, 1970). Sie besteht aus dem denaturierten Gerüst-eiweißstoff Kollagen (Hauptbestandteile: Glykokoll, Prolin, Hydroxyprolin), dessen -CO-NH-Verbindungen enzymatisch hydrolysiert werden können. Nach Erhitzen bzw. Abkühlen kann das gallertartige Eiweiß zu dünnen Filmmembranen verarbeitet werden, die äußerst widerstandsfähig und daher einfach zu handhaben sind (ROMPP, 1966). Bisher wurden die Membranen hauptsächlich zum qualitativen Nachweis proteolytischer Aktivitäten von Gewebsschnitten verwendet (OWERS, 1970; FRA-TELLO, 1968; ADAMS und TUQAN, 1961; DAOUST, 1965, 1966). Hierzu wurde die flüssige Gelatine auf einem Objektträger verteilt. BERGSTRÖM (1970) untersuchte die proteolytische Aktivität von Uterusepithel auf der Gelatinefilmemulsion handelsüblicher Farbfilme, indem er sie mit Phosphatpuffer bedampfte bzw. bei +37°C inkubierte. Nach Ablösen der Gewebeteile waren in der Gelatineschicht Auflösungsflächen festzustellen, deren Ausdehnung im Zusammenhang mit der Lysosomenanzahl pro Gewebeabschnitt stand. CUNNINGHAM (1967) stellte in seinen Versuchen zur Methodik heraus, daß die proteolytische Reaktion von Geweben auf Gelatinemembranen hauptsächlich vom pH-Wert der Inkubationsmedien (präparatabhängig), von der Inkubationstemperatur und der umgebenden Luftfeuchtigkeit abhängig ist.

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Methoden wiesen GADDUM und BLANDAU (1970) die proteolytische Aktivität von Säugetierspermien (Menschen-, Ratten- und Kaninchenspermien) auf fixierten, mit Tusche imprägnierten Gelatinemembranen

nach. Nebenhodenspermien reagierten nach Inkubation mit Barbitol-Acetat-Puffer (pH 7,5 - 9,5; +37°C) durch kreisförmige Auflösung der Gelatineschicht im Kopfbereich der Samenzellen. Die Lysis ging vom lateralen Akrosomenabschnitt aus und erreichte nach mehreren Stunden ein Maximum. Die Depolymerisationsfläche war proportional zur Akrosomengröße der einzelnen Versuchstierspermien. Durch Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (1,0 mg/ml Hank's-Lösung) konnte die Reaktion stark, wenn auch nicht völlig gehemmt werden. Hinsichtlich der Geschwindigkeit und der Intensität der Lysisreaktion bestanden zwischen den untersuchten Säugetierspermien beträchtliche Unterschiede. Spermien, die in der Nähe des ursprünglichen Ausstrichtropfens lagen, reagierten meist schneller und intensiver. Die Autoren führten dies auf physikalische Ursachen bzw. auf die Lage der Samenzellen zur Substratoberfläche zurück.

Da bei der Methode von GADDUM und BLANDAU (1970) die Spermienumrisse auf den tuschenhaltigen Substratmembranen undeutlich waren und inkonstante Ergebnisse lieferten, färbten BENITEZ-BRIBIESCA und VELAZQUEZ-MEZA (1972) die Gelatineschicht mit Ponceau-Lösung an. Die proteolytische Aktivität von epididymalen Menschen- und Rattenspermien zeigte sich als klarer Ring auf rotem Untergrund. Größe und Intensität der Auflösungskreise hing hauptsächlich von der Inkubationszeit ab. Bei Zusatz von Trypsin-Inhibitoren oder Formalin zur Spermien suspension blieb die Lysisreaktion aus. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von GADDUM und BLANDAU (1970), bei denen die meisten Spermien aktiv waren, reagierten nur etwa 60 Prozent der Samenzellen. Die Autoren nahmen an, daß bei der Tusche-Gelatine-Methode inaktive Zellen auf dem schwarzen Untergrund schwer auszumachen sind und daher nicht mitgezählt werden.

4.4.4. Quantitativ

GADDUM-ROSSE und BLANDAU (1972) benutzten schließlich tusche-freie Gelatinemembranen, um die Ablösung von Akrosin aus den Spermienakrosomen genauer lokalisieren zu können. Außerdem

versuchten sie über die Größe der Lysisflächen Rückschlüsse auf die Enzymaktivität der einzelnen Spermatozoen zu ziehen. Die Lysisreaktion begann, außer bei menschlichen Samenzellen, am lateralen Teil der Akrosomen von epididymalen Kaninchen-, Bullen- und Meerschweinchenspermien und breitete sich rasch um die Kopfkappen aus. Daher ist, nach Meinung der Autoren, das "Zonolysin" auf den Bereich des Äquatorialsegments beschränkt oder liegt an dieser Stelle in besonders konzentrierter Form vor. Wie bei früheren Versuchen (GADDUM und BLANDAU, 1970), waren auch diesmal dunkle, zirkuläre Ringe innerwärts der hellen Auflösungszone. Diese Erscheinungen wurden als Lichtschwankungen interpretiert, die bei Phasen-Kontrast-Objektiven auftraten. Die Spermien der einzelnen Tierarten unterschieden sich in Bezug auf die Lysisreaktion: Kaninchen-, Bullen- und Meerschweinchenspermien zeigten nach wenigen Minuten, Meerschweinchen- und Hamsterspermien erst nach einer Stunde. Innerhalb der Spezies war die Variation in bezug auf die Lysiskreisfläche/Präparat überraschend groß. Eine Erklärung hierzu wurde nicht gegeben.

PENN und Mitarbeitern (1972) gelang es nicht, das Verfahren von GADDUM und BLANDAU (1970) zu reproduzieren. Um die Methodik zu vereinfachen, benutzten sie autoradiographische Filmplatten (Kodak-AR-10) als Gelatinesubstrat. Der Vorteil dieses Verfahrens lag in der gleichmäßigen Verteilung der Gelatineschicht und der einfachen Anfertigung einzelner Filmmembranen. Die Filmplatten wurden kurz entwickelt und fixiert. 20 x 25 mm große Filmstreifen wurden aus der emulsionsbeschichteten Platte herausgeschnitten, in ein Wasserbad getaucht und auf Objektträgern getrocknet. Das Auftragen der Spermasuspension (pH 5,5 - 9,6) erfolgte nach Inkubation in Wasserdampf bei +37°C. Neben epididymalen wurden erstmals ungewaschene, ejakulierte Spermien von Kaninchen, Bulle, Hengst und Ratte verwendet. Größe und Intensität der Lysis ist in willkürlichen Einheiten gemessen worden. Innerhalb von 15 Minuten nach dem Auftragen bildeten sich bei ejakulierten Spermien mondartige Auflösungszone, sogenannte "Halos". Selbst unreife, testikuläre Samenzellen entwickelten

Lysishöfe, die allerdings um etwa 25% kleiner waren als die Depolymerisationsfläche der oben genannten Zellen. Nach 4-stündiger Inkubation war das Maximum der Gelatineproteolyse erreicht. Weder Trypsin- noch Chymotrypsin-Inhibitoren in der Spermiesuspension konnten die "Halo"-Bildung verhindern. Wurden jedoch die Filmmembranen mit den Proteasehemmern vorinkubiert, so reduzierte sich die Größe der "Halos" von Menschen- und HengstspERMien auf 50% gegenüber Kontrollwerten ohne Inhibitor. Aus diesem überraschenden Ergebnis folgerten die Autoren, daß der in Gelatinemembranen eingebettete Inhibitor wesentlich schneller mit Akrosin in Kontakt kommt, als Inhibitor in der Spermiesuspension, der an die äußere Membran der Samenzellen gebunden bleibt. DFP (Diisopropyl-fluorophosphat), ein unspezifischer, synthetisch hergestellter Trypsin-Inhibitor, hatte keine Hemmwirkung.

Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse von ALLEN und Mitarbeitern (1978) stimmen weitgehend mit Beobachtungen anderer Wissenschaftler überein (BENITEZ-RRIBIESTA und VILLAZQUEZ-MELA, 1977; GADDUM-ROSE und BLANDAU, 1972): Durch natürliche und synthetische Trypsin-Inhibitoren (Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, N-p-Tosyl-L-lysinchloromethylketon - TLCK), sowie durch Seminalplasma, wurde die Proteolyse von epididymalen Säugetierspermien auf Gelatine stark vermindert. Nach Inkubation der Spermatozoen mit 5 - 10% Formalin, handelsüblichen Netergentien (Triton X-100, Hyamin 2384, Alconox, NaOH) und gesättigten Kupfersulfat-Lösungen, blieb die Depolymerisation der Gelatinemembranen aus ALLEN und Mitarbeitern (1978) beruhten für den Aktivitätsnachweis unbelichtete, nicht entwickelte, fixierte Photoplatten. Die Lysisreaktion der Spermien ging vom Äquatorialssegment des Akrosoms aus. Der Reaktionsbeginn variierte zwischen den Spezies (Mensch und Bulle nach 30 Minuten, Ratte nach 24 Stunden). Die größte Lysisfläche wurde bei Bullen- und SchafspERMien ($18.1,3 \text{ } \mu\text{m}^2$ nach 24 Stunden), die kleinste bei MausspERMien festgestellt. Außerdem wurden Eber- und SchafspERMatozoen aus Hoden, Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz auf ihre lytische Aktivität hin überprüft. Sie nahm von

Testes- zu Nebenhodenschwanzspermien signifikant ($P \leq 0,01$) zu. Plasmatröpfchen zeigten keine Aktivität. Die Auflösungszonen erreichten nach 2 - 4 Tagen ein Maximum (bis $5000 \mu m^2$). Einfrieren und Auftauen der Spermien hatte keinen Einfluß auf die Ausdehnung der "Halos". Am Rande des Spermienausstriches auf Filmmembranen unterschieden sich, aus den Autoren unverständlichen Gründen, Lysisfläche und Reaktionsbeginn der aufgetragenen Samenzellen. Daher beschränkte sich die Auswertung der Auflösungszonen auf Spermien, die in unmittelbarer Nähe des ursprünglichen Ausstrichtropfens lagen. Die Autoren hielten es für unwahrscheinlich, daß das proteolytische Spermienenzym im Akrosom lokalisiert ist. Zwischen freiwerdender Aktivität und Akrosomengröße bestand, im Gegensatz zu Beobachtungen von GADDUM und BLANDAU (1970), kein Zusammenhang. Die Ablösung des Enzyms war durch degenerative Veränderungen der Spermien bedingt.

Biochemische Eigenschaften von Akrosin

Durch Reinigung über Molekularsiebe bzw. verschiedene Chromatographieverfahren konnte Akrosin aus den Akrosomen der meisten Säugetierspermien teilweise rein gewonnen werden (FINK und Mitarbeiter, 1972 a; GARNER und Mitarbeiter, 1971; HO und MEIZEL, 1970; POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972 a; FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a, 1972 b). Die Protease hat ein Molekulargewicht von 30.000 (POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972 a; FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 b) und stellt ein Gemisch aus Isoenzymen dar (GARNER und Mitarbeiter, 1971; HO und MEIZEL, 1970). Sein Aktivitätsoptimum liegt bei pH 8,0 (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a, 1972 b; SCHIESSLER und Mitarbeiter, 1972; FRITZ und Mitarbeiter, 1972 b) und unterscheidet sich dadurch vom sauren pH-Optimum "echter" lysosomaler Enzyme. Das Akrosom der Spermien ist daher als modifiziertes Lysosom anzusehen (ALLISON, 1967; ALLISON und HARTREE, 1969). Die akrosomale Protease wird, wie Pankreastrypsin, durch synthetisch hergestellte und natürlich vorkommende Trypsininhibitoren gehemmt.

Da Serin-Proteinasen auf die Neuraminsäure von Glykoproteinen der Zellmembranen einwirken, kommt es zu Zellverklebungen. Die Fähigkeit von Akrosin zur Agglutination von Menschen- und Bullenerythrozyten, sowie die Hemmwirkung von DPF und TLCK, beide Serinprotease-Inhibitoren, lassen daher Histidin und Serin im aktiven Zentrum vermuten (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a; UHLENBRUCK und Mitarbeiter, 1972). Das TLE (Trypsin like enzyme) hat die Eigenschaften von Serinproteasen (WALSH und WILCOX, 1970). Es wirkt als Endopeptidase und hydrolysiert, neben Gelatine (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1973 b), Casein, Fibrinogen, Hämoglobin und Ribonuclease. Bei der Spaltung von Ribonuclease durch TLE werden weniger Peptidbindungen hydrolysiert als durch Pankreastrypsin (Akrosin: 3; Trypsin: 12). Weiterhin unterscheidet sich Akrosin von Trypsin durch folgende Eigenschaften (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a): Akrosin ist weniger stabil und hat ein höheres Molekulargewicht als Trypsin. Es wird durch Ovarin, Plasmin, Trypsin-Inhibitoren und Alpha₁-Antitrypsin weniger gehemmt und ist gegenüber dem Pankreasenzym durch eine höhere Substratspezifität gekennzeichnet. Chymotrypsin-substrate wie BTEE (Benzoyl-tyrosin-äthylester) und ATEE (Acetyl-tyrosin-äthylester) werden durch TLE nicht umgesetzt.

2.2.4. Akrosininhibitoren

HAENDLE und Mitarbeiter (1965, 1970) fanden als erste in den Samenbläschen von Mäusen eine hohe Inhibitorkapazität gegen Trypsin. Diese Inhibitorwirkung war auch in Extrakten aus Vesikulardrüsen oder Sperma anderer untersuchter Säugetiere nachweisbar. Zwischen InhibitorKonzentration und androgenem Hormonspiegel bestand ein enger Zusammenhang. Die Kastration von Mäusen führte zu einem erheblichen Abfall der InhibitorKonzentration in den Samenbläschen. Nach Testosterongabe stieg sie um das 50fache des Normalwerts an. Zu Beginn der Testosteronbehandlung nahm der Inhibitorspiegel proportional zum Wachstum der Vesikulardrüsen zu. Die Autoren stellten fest, daß der Hemmstoff zur Gruppe der Trypsininhi-

bitoren gehört, waren sich aber über die physiologische Bedeutung nicht sicher.

Inzwischen wurden aus Meerschweinchen-, Menschen- und Eberseminalplasma mehrere Isoinhibitoren als Polypeptide über Affinitätschromatographien isoliert (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 b). Sie unterscheiden sich in ihrem Hemmspektrum, ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrem Molekulargewicht. Als gemeinsames Merkmal gilt jedoch die starke Affinität zu Pankreastrepsin und zur Spermienprotease Akrosin (PINK und Mitarbeiter, 1972 a, 1972 b; FRITZ und Mitarbeiter, 1972 e, 1972 f). ZANEVELD und Mitarbeiter (1970 a) sowie SCHUMACHER und ZANEVELD (1972) kamen zu dem Ergebnis, daß die Akrosinaktivität epididymaler und kapazitierter Spermien wesentlich höher war als bei ejakulierten Samenzellen. Dieses Phänomen wurde folgendermaßen erklärt (FRITZ und Mitarbeiter, 1971): Bei der Ejakulation werden über die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen große Inhibitormengen ausgeschieden, die das Akrosin der Spermien maskieren. Während der Katartisation erfolgt die Ablösung dieser Hemmstoffe. Das Enzym wird frei und kann auf die Eihüllen einwirken. Über die genaueren Vorgänge ist allerdings wenig bekannt. Vorläufig bleibt auch noch unklar, ob der Inhibitor durch die Akrosomenmembranen eindringt und mit Akrosin einen reversiblen Komplex bildet, oder ob er an die äußere Akrosomenhülle gebunden wird.

Folgende natürlich vorkommende und synthetisch hergestellte Trypsin-Inhibitoren können die Akrosinaktivität reversibel bzw. irreversibel hemmen:

- a) Natürlich vorkommende Trypsin-Inhibitoren (reversible Hemmung)
 - SPTI (Seminalplasma-Trypsin-Inhibitoren) (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 e, 1972 f; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1970 a, 1971 b, 1973 c)
 - PTI (Pankreas-Trypsin-Inhibitoren) (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 d, 1972 e; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1971 b)
 - Inhibitoren aus Humanserum: Alpha₁-Antitrypsin,

Anti-Thrombin III, Inter-alpha-Trypsininhibitor
(FRITZ und Mitarbeiter, 1972 g)

- Akrosininhibitor aus Rete-Testis-Flüssigkeit
(SUOMINEN und Mitarbeiter, 1973)
- Immunoglobuline aus Antikörpern gegen menschliche
Akrosomenextrakte (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1973 b)
- Inhibitoren aus Blutegeln, Sojabohnen, Erdnüssen,
Rinderkolostrum und Seeanemonen (FRITZ und Mitarbei-
ter, 1972 f)
- Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen
(FRITZ und Mitarbeiter, 1972 c)

b) Synthetisch hergestellte Inhibitoren (irreversible
Hemmung)

- TLCK (N-p-Tosyl-L-lysinchloromethylketon)
- DFP (Di-isopropyl-fluorophosphat)

Natürliche Inhibitoren bilden in vitro mit Akrosin einen re-
versiblen Protease-Inhibitor-Komplex, der in saurer Lösung
bei Substratüberschuß spontan dissoziiert (FINK und Mitarbei-
ter, 1972 a; FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a). In vivo dagegen
ist die sofortige Ablösung des Hemmstoffes während der länger
andauernden Kapazitation - beispielsweise 6 Stunden beim Rind
(BEDFORD, 1970 a) - und auf Grund des pH-Werts im weiblichen
Genitale (EIBL, 1959) unwahrscheinlich. Entweder besitzen die
Genitalsekrete einen Faktor, der die Dissoziation induziert,
oder die Reaktionspartner bilden unter in vivo Bedingungen
keinen Komplex (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1973 c). Im letzteren
Fall ist die Bindung des Inhibitors an eine polyelektrolytische,
äußere Kopfkappenmembran vorstellbar (FRITZ und Mitarbeiter,
1971; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a); Untersuchungen von
HIRSCHHAUSER und BAUDNER (1972) sowie SCHILL (unveröffentlicht)
weisen darauf hin. Daher bleibt fraglich, inwieweit synthetisch
hergestellte Trypsin-Inhibitoren in der Lage sind, die Plasma-
und äußere Akrosomenmembran zu durchdringen. Da Akrosin bei in
vitro Versuchen durch synthetisch hergestellte Hemmstoffe ir-
reversibel gebunden wird (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 b; ZANE-
VELD und Mitarbeiter, 1973 c), könnte auf diesem Wege eine anti-
enzymatische Kontrazeption erreicht werden (FRITZ und Mitarbei-
ter, 1972 b)

2.2.5. Akrosin und Befruchtung

Beim Befruchtungsvorgang hat Akrosin zwei wichtige Funktionen:

- a) Auflösung der Zona pellucida des Ovums
- b) Beteiligung beim Polyspermieblock

Die spezifische Wirkung von Akrosin auf die Zona pellucida wird durch folgende Befunde bestätigt:

- Die Zona kann enzymatisch nur durch Trypsin aufgelöst werden (GWATKIN und Mitarbeiter, 1973; PAVLOK und McLAREN, 1972; HARTMANN und GWATKIN, 1971). Die akrosomale Protease Akrosin hat trypsinähnliche Eigenschaften (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a, 1972 b; FINK und Mitarbeiter, 1972 a; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a; UHLENBRUCK und Mitarbeiter, 1972; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1969).
- Natürliche und synthetisch hergestellte Trypsin-Inhibitoren können die Auflösung der Zona durch akrosomale Spermienextrakte in vitro verhindern (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1968; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1971 b).
- Das Befruchtungsvermögen kapazitierter Spermien in vivo ist nach Inkubation mit Trypsin-Inhibitoren deutlich eingeschränkt (FRITZ und Mitarbeiter, 1971; SUOMINEN und Mitarbeiter, 1973; NEWELL und WILLIAMS, 1972; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1971 b).
- Vor Erreichen der Zona pellucida ist das Akrosom der Spermien bereits abgelöst (GWATKIN und Mitarbeiter, 1973; YANAGIMACHI und NODA, 1972 a; EDWARDS, 1972); nur die innere Membran und das Äquatorialssegment bleiben erhalten. Akrosin ist an die innere Akrosomenmembran gebunden oder ein Bestandteil dieser Struktur (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1969, 1972).

Die Beteiligung von Akrosin beim Polyspermieblock wird nach folgenden Versuchen wahrscheinlich:

Wurden cumulusfreie Goldhamstereier mit kleinsten Mengen Trypsin (0,06 - 0,09 $\mu\text{g/ml}$) oder Alpha-Chymotrypsin behandelt, so war die Anzahl der an die Zona angehefteten, kapazitierten Spermien wesentlich geringer als bei unbehandelten Eiern. Nach Inkubation der Trypsinlösung mit Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor konnten sich jedoch alle kapazitierten Samenzellen an der Zona freisetzen. Trypsin und Trypsin-Inhibitor wirkten augenscheinlich nur auf die Zona, nicht auf sonstige Eihüllen. HARTMANN und GWATKIN (1971) schlossen daher aus, daß die Spermienblockierung durch kortikale Granula des Vitellus im Verlauf der Zonareaktion (DICKMANN, 1965) zustande kommt; ihrer Meinung nach waren die trypsinspezifischen Rezeptoren auf der Zonamembran lokalisiert. Sie stellten außerdem fest, daß ein spermieeigener Faktor, der wahrscheinlich im Verlauf der Kapazitation frei wird, bei der Induktion des Polyspermieblocks beteiligt sein muß: Wurden nämlich nicht kapazitierte oder gewaschene Spermien verwendet, so konnten sich überdurchschnittlich viele Samenzellen an der Hülle des Ovums anheften. Bei artfremden Eiern blieb diese Erscheinung allerdings aus; die Rezeptoren schienen artspezifisch zu sein.

Die Zonareaktion und der damit verbundene Polyspermieblock konnte in vitro nicht nur durch Behandlung der Eier mit einem induzierenden Enzym von außen, sondern auch durch Ablösung eines trypsinähnlichen, eihüllengebundenen Faktors ausgelöst werden. GWATKIN und Mitarbeiter (1973) gelang es, die kortikalen Granula vom Vitellus durch elektrische Stimulation abzulösen bzw. zum Platzen zu bringen. Innerhalb von 8 Minuten wurde durch das freie Granulamaterial die Zonareaktion induziert. Kapazitierte Spermien waren nicht mehr in der Lage, sich an die Zona pellucida derartig vorbehandelter Eizellen anzuheften. Durch Trypsin-Inhibitoren konnte die Reaktion verhindert werden; die Trypsinähnlichkeit der Granulasubstanz war offenkundig. Ihre Wirkung schien, im Gegensatz zu Beobachtungen von HARTMANN und GWATKIN (1971), nicht artspezifisch, da kortikales Material von Hamstereiern auch die Zonareaktion bei Mäuseeizellen induzierte.

VACQUIER und Mitarbeiter (1972) stellten schließlich beim Seeigel fest, daß ein befruchtendes Spermium die Ablösung der kortikalen Granula verursacht und die überzähligen Spermienzellen dadurch zurückgehalten werden.

FRITZ und Mitarbeiter (1972 b) und andere (MOOR und CRAGLE, 1971; CONRAD und Mitarbeiter, 1971) sind der Ansicht, daß die von HARTMANN und GWATKIN (1971) erwähnten Rezeptoren auf der Zona nicht nur trypsin-, sondern auch akrosinsensibel sein könnten. Sie nehmen weiterhin an, daß es eventuell beim ersten Kontakt des befruchtenden Spermiums mit der Zona zu einem Akrosin-Substrat-Komplex kommt, wobei sich die akrosinhaltige innere Spermienmembran über Peptidbindungen an die Oberfläche der Zona anheftet. Andere Spermien sind dadurch nicht mehr in der Lage, sich an die besetzten Bindungen anzukuppeln; eine Polyspermie wird verhindert.

Die Zona pellucida kann aus diesen Beobachtungen als eigentliche Barriere zwischen Spermium und Ei angesehen werden.

Sie besteht aus zwei mucoproteinhaltigen, getrennten, konzentrischen Lagen mit äußerer, granulöser und innerer, homogener Schicht (DICKMANN, 1965). Die Penetration durch Spermien erfolgt meist in einer tierartspezifischen Weise: Eber- und Schafpermatozoen treten im spitzen Winkel (15°) in die Zonagen ein und treffen senkrecht auf die vitelline Membran auf. Dadurch entsteht in den Zonaschichten ein winziger Kanal mit charakteristischem Kurvenverlauf ("Penetrationskurve"). Hat das Spermatozoon die äußere Schicht passiert, so kommt es zur "Zonareaktion": Die restlichen Spermien sind nicht mehr in der Lage, die innere Zonamembran zu durchdringen.

Verhalten des Akrosoms und des Proteins Akrosin in vivo und in vitro
Bedingungen

Die bisher beschriebenen, enzymatischen Untersuchungen an den Akrosomen von Säugetierspermien bezogen sich fast ausschließlich auf die Wirkung der akrosomalen Enzyme bei der Befruchtung des Eies. In dieser Zusammenhang wurde in der

des Akrosins als Schlüsselenzym bei der Eihüllenpenetration überzeugend demonstriert werden. Über die Anwendung der Akrosinbestimmung im klinisch-diagnostischen Bereich ist demgegenüber wenig bekannt. Die Ergebnisse von SCHILL (1973 a) sowie SCHIRREN und EWEIS (1973), die eine Akrosinbestimmung erstmals parallel zur morphologischen Spermabeurteilung von Menschenejakulaten einsetzten, zeigten jedoch, daß sich pathologische und physiologische Akrosomenveränderungen auch auf das enzymatische System der Kopfkappe auswirken. Akrosomenalterationen, wie sie beispielsweise an Bullenspermien nach Tiefgefrierung (VERES und Mitarbeiter, 1972; WATSON und MARTIN, 1971), Spermaverdünnung (VERES und Mitarbeiter, 1972) oder Spermienfixierung (SAACKE und MARSHALL, 1968) auftreten, sind mit den üblichen, morphologischen Untersuchungsmethoden nicht immer einwandfrei zu erkennen. Es lag daher nahe, die Akrosinaktivität als zusätzlichen Parameter in der Diagnostik von Kopfkappenschäden einzusetzen. Die im folgenden beschriebenen Veränderungen des akrosomalen Systems unter in vivo und in vitro Bedingungen sollen den klinischen Anwendungsbe reich der biochemischen Enzymanalyse deutlich machen.

Die Plasmamembranen der Spermien differieren, je nach Tierart, in ihren physikalischen Eigenschaften (JONES, 1973 a). Plötzliche Veränderungen des osmotischen Drucks, die z.B. bei Spermaverdünnungen auftreten, scheinen sich besonders schädlich auf die Membranen von Schaf- und Eberspermien auszuwirken. Vor allem im Kopfbereich wurden nach Suspension der Spermien in unterschiedlich konzentrierten Pufferlösungen Rupturen und Ablösungen der Membranen beobachtet. Bullenspermien erwiesen sich als relativ widerstandsfähig. Daher ist beispielsweise die Gefriertauglichkeit der Samenzellen von tierartlich unterschiedlicher Membranstabilität abhängig.

Nach der chemischen und physikalischen Noxe läuft die Degeneration akrosomaler Spermienmembranen in bestimmter Reihenfolge ab (SAACKE und MARSHALL, 1968; JONES, 1973 b). Dies wird am Beispiel von Bullenspermien deutlich: Die apikale Plasmamembran löst sich unter Faltenbildung von der Akrosomen-

membran ab und bricht im vorderen Bereich der Kopfkappe auseinander, wobei das Äquatorialsegment meist intakt bleibt. Schließlich wird das gesamte Akrosom abgestoßen und elektromendichtes Material fließt aus.

VERES und Mitarbeiter (1972) untersuchten die Spermatozoen von Bullen vor und nach dem Tiefgefrieren im flüssigen Stickstoff. Obwohl mit der üblichen morphologischen Spermienbeurteilung nicht erkennbar, zeigten die Samenzellen mangelhaft gefriertauglicher Ejakulate bei elektronenmikroskopischer Betrachtung vor und vermehrt nach dem Tiefgefrierprozeß Alterationen im Bereich der Akrosomen (Schwellungen, Ablösungen, Brüche). Da die Spermien vor dem Tiefgefrieren in Verdünner suspendiert wurden, nahmen die Autoren an, daß nicht nur die Temperatur, sondern auch die Spermaverdünnung derartige Defekte verstärken oder verursachen können.

Durch kryobiologische Behandlung von Spermien extrahierte PEDERSEN (1972) akrosomale Enzyme. Die damit verbundenen Membranschädigungen führten zum Verlust des Akrosomeninhalts. Besonders stark ist dieser Effekt nach rascher Abkühlung der Zellen (CHURCH und GRAVES, 1973): Die Proteaseaktivität von Bullenspermien war nach Einwirkung eines Kälteschocks wesentlich verringert. Dabei reagierten gewaschene Spermatozoen überaus empfindlich. Im Verlauf der Akrosomenschädigungen floß ein hoher Enzymanteil durch rupturierte Membranen in das umgebende Verdünnungsmedium aus. Seminalplasma und Eidotter konnten den Aktivitätsverlust herabsetzen.

Aus Untersuchungen von SCHILL (1973 b) geht allerdings hervor, daß Eidotter als Kryoprotektivum bei Humanspermien weniger geeignet ist als Glycerin. Im Mittel kam es jedoch durch die kryobiologische Behandlung zu einem Aktivitätsverlust gegenüber dem Nativsperma, obwohl bei einer kleinen Gruppe von Ejakulaten nach Zusatz von 10% Glycerin vor dem Tiefgefrieren eine Aktivitätssteigerung beobachtet wurde. Eventuell kann, nach Aussage des Autors, die verbesserte Enzymextraktion nach Zugabe von Glycerin auf noch nicht näher zu definierende Membraneffekte oder auf Aktivierung eines Proenzyms

zurückzuführen sein.

Neben den oben beschriebenen Veränderungen in vitro scheinen auch unter in vivo Bedingungen Akrosomenalterationen aufzutreten. Es zeigte sich beispielsweise ein Zusammenhang zwischen Dauer des Nebenhodenaufenthalts von Spermien und dem Anteil veränderter Akrosomen/Ejakulat (WELLS und Mitarbeiter, 1970 a, 1970 b).

Nach Abschluß der Spermatogenese machen die Samenzellen im Nebenhoden einen "zweiten Reifungsprozess" durch (MANN, 1964). Ihr Protoplasma wird dehydriert, die Plasmatröpfchen abgestoßen (MANN, 1964). Epididymale Spermien sind wenig beweglich und unterscheiden sich von ejakulierten Samenzellen durch ihr besonderes Stoffwechselverhalten (verschobenes K-Na-Verhältnis). Ihre relativ große Widerstandsfähigkeit gegen Kälteschäden ist wahrscheinlich auf einen membranschützenden Effekt der lipoproteinhaltigen Nebenhodensekrete zurückzuführen. Demgegenüber steht allerdings die hohe Empfindlichkeit der Spermienhüllen nach Suspension in Ringer-Lösung. Mit Ausnahme der oben erwähnten Akrosomenalterationen, sowie Änderungen in Motilität, Dichte und Überlebensrate, bleiben andere Kriterien der Spermmorphologie nach längerem Nebenhodenaufenthalt unverändert (EL-SAWAF und EL-WISHY, 1970; HAFS und Mitarbeiter, 1959).

WELLS und Mitarbeiter (1970 a) untersuchten die Einwirkungen unterschiedlicher Deckbeanspruchung von Bullen auf den Akrosomenstatus der Spermien. Die Tiere standen unter gleichen Haltungsbedingungen und über den gleichen Zeitraum im Versuch, um saisonale Einflüsse auf das akrosomale System (WELLS und Mitarbeiter, 1972) auszuschließen. Wurde die Frequenz der Spermagewinnung von 1x wöchentlich auf 4x wöchentlich erhöht, so fiel der Anteil geschädigter, degenerierter Akrosomen von 17 auf 5% ab. Nach anschließender, 6-wöchiger Deckpause stieg der Prozentsatz veränderter Akrosomen erneut an und erreichte mit 42,2% ein Maximum. Schließlich konnte innerhalb von 2 Wochen durch 4x wöchentliche Spermagewinnung der Anteil geschädigter Akrosomen (Membranschwellungen, -ablösungen, -rupturen) auf den Ausgangswert (5%) reduziert werden. Wurden Besamungsbullen saisonal deseminiert, so war die Spermaqualität während der Deck-

pause wesentlich schlechter als in der Decksaison (WELLS und Mitarbeiter, 1970 b). Außerdem konnte statistisch gesichert werden, daß zwischen Akrosomenveränderungen von Bullenspermien und den Non-Return-Raten nach Erstbesamungen mit den entsprechenden Ejakulaten deutliche Zusammenhänge bestehen (WELLS und Mitarbeiter, 1973). Interessanterweise zeigen diese Ergebnisse Parallelen zu Versuchen von SCHMIDT und Mitarbeitern (1957), die mit 315 Ejakulaten von 98 Bullen 856 Inseminationen durchführten. Beste Spermaquantität (bezogen auf Ejakulatvolumen, Dichte, Gesamtspermienzahl/Ejakulat) hatten Tiere mit 4-tägiger Deckpause. Optimale Spermaqualität (Befruchtungsfähigkeit, gemessen nach Anzahl der Inseminationen pro Konzeption) zeigten jedoch Bullen, die im 8-Tage-Intervall desaminiert wurden. Die Konzeptionsrate mit diesem Sperma war signifikant höher als mit Ejakulaten von Tieren, die häufiger (1x täglich) bzw. seltener (2x monatlich) zur Samengewinnung herangezogen wurden.

Die Mechanismen, die den Ergebnissen von SCHMIDT und Mitarbeitern (1957) sowie WELLS und Mitarbeitern (1970 a, 1970 b, 1973) zugrunde liegen, wurden von den Autoren jedoch nicht erklärt.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Versuchstiere und Versuchsanordnung

Als Versuchstiere standen 8 Fleckviehbullen im Alter von 1 - 2 Jahren zur Verfügung, die in unterschiedlichen Zeitabständen zur Spermagewinnung herangezogen wurden. Aus den Spermien von 82 Ejakulaten wurde das trypsinähnliche, akrosomale Spermienenzym Akrosin extrahiert und die Aktivität photometrisch bestimmt. Parallel hierzu konnte die proteolytische Akrosinwirkung bei den einzelnen Samenzellen auf Gelatinesubstratfilm nachgewiesen werden. Die um den Spermienkopf entstandene Lysisfläche auf autoradiographischen Stripping-Platten wurde bei 150 Spermien/Ejakulat mit einem Okularmikrometer ausgewertet.

Die makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Ejakulate erfolgte unmittelbar nach Spermagewinnung.

3.1.1. Gruppeneinteilung

Der Einfluß unterschiedlicher Deckbeanspruchung auf die biochemisch und histochemisch erfaßbare Akrosinaktivität von Bullenspermien sollte mit folgender Gruppeneinteilung überprüft werden:

Gruppe A (Bulle 45,48,52): 5malige Spermagewinnung täglich (innerhalb einer Stunde)
über 4 Wochen (Montag mit
Freitag)

Gruppe B (Bulle 52,44,47): Spermagewinnung 2 mal wöchentlich im Abstand von 2 - 3
Tagen über 4 Wochen

Gruppe C (Bulle 53,50,51): 3malige Spermagewinnung innerhalb von 6 Wochen im Abstand
von 14 Tagen

Aus arbeitstechnischen Gründen wurde der Versuch in drei aufeinanderfolgenden Zeitabschnitten von jeweils 4 bzw. 6 Wochen durchgeführt. Pro Zeitabschnitt stand je ein Bulle

der Gruppe A, B und C zur Verfügung. Wie aus der Gruppeneinteilung hervorgeht, ist Bulle 52 sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B eingesetzt worden.

3.1.2. Gewinnung und Untersuchung der Ejakulate

Die Spermagewinnung erfolgte mit der künstlichen Scheide und einem männlichen Tier als Aufsprungpartner. Bei den Bullen der Gruppe A wurde im Abstand von 10 Minuten innerhalb einer Stunde deseminiert und jeweils nur das erste und fünfte Ejakulat untersucht. Die makroskopische und mikroskopische Auswertung der Ejakulate wurde, wie bei den Tieren der Gruppen B und C, nach folgenden Kriterien vorgenommen:

I. Makroskopisch

- Volumen (ml)
- Farbe
- Konsistenz

II. Mikroskopisch

- Dichte (Zählkammer nach Bürker-Türk; Anzahl der Spermien/mm³)
- Motilität (bei +38°C)
 - Massenbewegung
 - Einzelbewegung (Vorwärtsbewegung in %)
- Morphologie (Tuscheausstrich; 300 ausgewertete Spermien/Ejakulat)
 - primäre und sekundäre Mißbildungen
- Lebend-Tot-Färbung (Bromphenolblau; 300 ausgewertete Spermien/Ejakulat)
- Fremdzellgehalt

III. Chemisch-physikalisch

- pH-Wert (mit Indikatorpapier)
- Schalm-Test zum Nachweis von Leukozyten

3.1.3. Lagerung der Ejakulate

Um die Auswirkungen von Lagerzeit, Lagertemperatur und Verdünner auf die Akrosinaktivität von Bullenspermien überprüfen zu können, wurden einzelne Ejakulatportionen (mindestens 2 Ejakulate/Tier) unter folgenden Bedingungen aufbewahrt:

- 0,5 ml Ejakulat ohne Verdünner bei $+4^{\circ}\text{C}$
- 0,5 ml Ejakulat ohne Verdünner bei -20°C
- 0,5 ml Ejakulat mit 2,0 ml glyzerinhaltiger Verdünner-Stammlösung bei $+4^{\circ}\text{C}$
- 0,5 ml Ejakulat mit 2,0 ml glyzerinhaltiger Verdünner-Stammlösung bei -20°C

Lagerzeit: 4 - 6 Tage

Für die Ejakulatlagerung wurde nur die Stammlösung des Verdünners nach STEINBACH und FOOTE (1964) verwendet, da ein starker Einfluß des fermenthaltigen Eidotters auf die proteolytische Reaktion der Spermien auf Substratfilmen nicht auszuschließen war.

Die Stammlösung des Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Verdünners hatte folgende Zusammensetzung:

- 6,056 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- 3,400 g Zitronensäure
- 1,250 g Fruktose
- 168,000 ml Aqua dest.

Die Lösung wurde kurz aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit 1000 I.E. Penicillin, 1000 µg Streptomycin und 50 µg Polymyxin pro ml vermischt.

Nachdem Sperma und Stammlösung im Wasserbad $+20^{\circ}\text{C}$ erreicht hatten erfolgte die Verdünnung (1 Teil Sperma, 4 Teile Verdünner). Anschließend wurde Glycerin bis zu einem maximalen Anteil von 40 Prozent tropfenweise zugefügt. Die jeweils auf-

geführten Glyzerinanteile geben die Endkonzentration an.

3.2. Methoden

3.2.1. Photometrische Akrosinbestimmung (modifiziert nach FINK und Mitarbeitern, 1972 a)

3.2.1.1. Gewinnung der Akrosomenextrakte

Aus jeweils 1ml frischem bzw. gelagertem Ejakulat wurde das Akrosin der Spermien folgendermaßen extrahiert:

- 1ml Ejakulat wurde in 0,5ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, 20 Minuten bei 600g und $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand (Seminalplasma) verworfen;
- das Sediment wurde 4×10 Minuten bei 600g und $+4^{\circ}\text{C}$ erneut zentrifugiert und die Spermien in jeweils 5ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert;
- anschließend wurde das Spermiesediment mit 5ml 2%iger Essigsäure (pH 2,6) versetzt und mindestens 3 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert; hierbei wurde das Akrosin aus den Akrosomen extrahiert;
- nach 30 Minuten langer Zentrifugation bei 1000g und $+4^{\circ}\text{C}$ konnte der Überstand (Akrosomenextrakt) über das kombinierte Testsystem photometrisch ausgewertet werden;
- um die Oberflächenadsorption des Akrosins an Glas zu vermeiden, wurden für alle Verfahrensschritte Plastikgefäße verwendet.

3.2.1.2. Quantitative photometrische Akrosinbestimmung

Als synthetisches Substrat für Akrosin diente BAEE (Benzoyl-L-arginin-äthylester) in Kombination mit Alkoholdehydrogenase (ADH) und Nicotinamid-dinucleotid (NAD^{+}). Das Prinzip des Reaktionsablaufes basiert auf zwei enzymatischen Umsetzungen:

Akrosin spaltet das Substrat BAEE. Das hierbei freigesetzte Äthanol wird mit Hilfe von NAD photometrisch bestimmt.



Folgende Reagenzien wurden benutzt:

- BAEE (N-alpha-Benzoyl-arginin-äthylester; 10 mg/10 ml H_2O)
- NAD (ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid; 20 mg/1 ml H_2O)
- ADH (Alkoholdehydrogenase; konzentrierte Suspension)
- Pyrophosphatpuffer (Zusammensetzung:
 - 15,2 g Natriumpyrophosphat
 - 4,1 g Semicarbazid
 - 0,9 g Glycin
 - ad 500,0 ml Aqua dest.

Der Puffer wurde mit 1n NaOH auf pH 8,7 eingestellt.)

Alle Reagenzien wurden im Kühlschrank bzw. Eisbad (während der Akrosinbestimmungen) gelagert. Die Enzymbestimmungen erfolgten mit einem Photometer der Firma Eppendorf.

Für die einzelnen Meßansätze sind pro Küvette verwendet worden:

ca. 2,4 ml Pufferlösung (die endgültige Menge war von der jeweils eingesetzten Akrosomenextraktmenge abhängig; das Endvolumen/Küvette mußte 3 ml betragen)

0,02 ml ADH
0,5 ml BAEE
0,1 ml NAD

Meßbedingungen in den 6 Küvetten: 25°C; pH 8,5

Die Messansätze/Küvette wurden mit einem Plastikspatel gut gemischt, 5 Minuten bei 25°C inkubiert und anschliessend mit dem Enzym (Akrosomenextrakt) versetzt. Die eingesetzte Menge Akrosomenextrakt (0,01 - 0,1 ml) war so bemessen, daß der

Extinktionszuwachs/Minute Δ_E von 0,01 nicht überstieg. Nach Inkubation (2 Minuten) des Enzym-Substrat-Gemisches wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten mit Filter Hg 366 gemessen. Unter Berücksichtigung des Leerwerts (Substratansatz ohne Akrosin) konnte die Enzymaktivität der Probe (mU/ml Sperma) mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors ($0,0011 \Delta_E = 1 \text{ mU}$) ermittelt werden. Dabei wird davon ausgegangen, daß eine Milli-Einheit (1mU) Akrosin bei der BAEE/ADH-Spaltung einer Extinktionsänderung von $0,0011 \Delta_E/\text{Min.}$ entspricht. Die Verdünnung und Einsatzmenge des Akrosomenextrakts wurden in die Berechnung einbezogen:

$$\frac{(\Delta_E \text{ Probe/Min.}) - (\Delta_E \text{ Leerwert/Min.})}{\text{Faktor } (0,0011)}$$

$$\times \text{Verdünnung (ml Essigsäure)}$$

$$\times \text{Einsatzmenge (bezogen auf 1 ml: } \frac{1 \text{ ml}}{\text{Einsatz}})$$

$$= \text{mU Akrosin/ml Sperma}$$

Anschließend erfolgte unter Einbeziehung der Spermiendichte pro mm^3 die Umrechnung auf mU Akrosin/ 10^8 Spermien:

$$\text{Anzahl der Spermien/mm}^3: n \times 10^6$$

$$\text{Anzahl der Spermien/ml} : 1000 n \times 10^6$$

$$= 10 n \times 10^8$$

$$\text{mU Akrosin}/10^8 \text{ Spermien} =$$

$$\frac{\text{mU Akrosin/ml}}{10 n}$$

3.2.1.3. Eigene Voruntersuchungen zur photometrischen Akrosinbestimmung

Die von FINK und Mitarbeitern (1972 a) angegebene photometrische Akrosinbestimmung beim Eber (30 Minuten Extraktionsdauer bei pH 1,8) mußte beim Bullen in folgenden Punkten modifiziert werden:

a) Extraktionsdauer der Spermiensedimente

Die Extraktionsdauer der Spermien mit 2%iger Essigsäure (pH 2,6) stand in Zusammenhang mit der extrahierbaren Akrosinmenge. An drei Bullenejakulaten konnte durch unterschiedlich lange Extraktion des Spermiensediments (30, 60, 120, 180 Minuten, 24, 48, 72 Stunden) ein Ansteigen der Enzymaktivität innerhalb der ersten zwei Stunden nachgewiesen werden (3,7 - 12,1 Prozent). Nach ca. 180 Minuten erreichte die Aktivität ein Maximum, das bei +4°C und pH 2,6 über 48 Stunden unverändert blieb. Die Spermien der auszuwertenden Ejakulate wurden daraufhin mindestens 180 Minuten extrahiert und die Enzymmenge im Akrosomenextrakt innerhalb von 2 Tagen ermittelt.

b) pH-Wert bei saurer Extraktion

Durch die bei Eberspermien übliche Extraktion mit 2%iger Essigsäure (pH 1,8 - 2,2) konnte aus den Samenzellen von Bullen keine Akrosinaktivität gewonnen werden. Um den optimalen pH-Bereich bei saurer Extraktion abzugrenzen, wurden gleiche Spermiemengen von 10 Bullenejakulaten bei einem pH-Wert zwischen 2,0 und 3,0 extrahiert. Die maximale Akrosinaktivität konnte bei pH 2,5 - 2,6 festgestellt werden. Die Spermienextraktion für weitere photometrische Akrosinbestimmungen erfolgte deshalb bei einem pH-Wert von 2,6.

3.2.2. Akrosinbestimmung auf Gelatinefilmplatten (modifiziert nach PENN und Mitarbeitern, 1972)

Prinzip (Abb. 3): Die Glasfläche von autoradiographischen Stripping-Platten (Kodak AR-10) ist mit einer dünn in Gelatine (10 Mikron) eingebetteten Filmemulsion (5 Mikron) beschichtet. Im Bereich der proteolytischen Akrosinwirkung (akrosomale Region der Spermien) wird die Gelatinemembran depolymerisiert. Die dunklen Silbergranula der Filmschicht werden dadurch frei und setzen sich am Rande der Auflösungszone ab. Dies führt

zu einer verstärkten Lichtdurchlässigkeit im Lysisbereich, der bei mikroskopischer Betrachtung als helle, kreisförmige Fläche erscheint.

3.2.2.1. Vorbereitung der autoradiographischen Platten

Für das Auftragen der Gelatine-Film-Membranen auf Objektträger wurden die AR-10-Platten folgendermaßen vorbehandelt:

- die Filmplatte wurde 10 Minuten bei Tageslicht belichtet
- anschließend 2 Sekunden in Kodak D-19-Entwickler getaucht und 6 Sekunden in deionisiertem Wasser gespült
- nach dem Fixierbad in Kodak Unifix (25 Sekunden) wurde erneut in Aqua dest. gespült (25 Sekunden)
- in vertikaler Lage wurde die Platte bei Raumtemperatur getrocknet

Auf diese Weise konnte eine dunkelbraune Emulsionsschicht hergestellt werden, die nach dem Fixierbad unempfindlich gegen Lichteinwirkung war.

3.2.2.2. Übertragen der Filmmembranen auf Objektträger

Mit einer Rasierklinge wurden 1x1cm große Quadrate aus der Plattenschicht geschnitten, mit der Pinzette von der Glasfläche abgelöst und auf die Wasseroberfläche einer mit Aqua dest. gefüllten Wanne gelegt (Emulsionsseite nach oben; Wassertemperatur 19-22°C). Die Filmmembran wurde bis zum Aufquellen der Gelatine (ca. 1 Minute) im Wasserbad belassen. Durch Unterschieben eines fett- und staubfreien Objektträgerglases konnte die Membran anschließend von der Wasseroberfläche abgehoben werden. Die aufgetragenen Gelatine-Film-Membranen trockneten bei senkrechter Lage der Objektträger und bei Raumtemperatur. Auf die oben beschriebene Weise konnten aus einer autoradiographischen Platte ca. 80-90 einzelne Filmstrips angefertigt werden, die bis zum Gebrauch bei Kühlschranktemperatur lagerten und unbeschränkt haltbar waren.

3.2.2.3. Inkubation der Ejakulate und Gelatinesubstratfilme

Von jedem Ejakulat, das auf Gelatinemembranen aufgetragen werden sollte, wurde unmittelbar nach der Gewinnung 0,1 ml Sperma 30 Minuten lang bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Die substratfilmbeschichteten Objektträger wurden 30 Minuten vor dem Auftragen der Spermien mit einer auf pH 8,1 (pH-Optimum für die Spaltungsaktivität trypsinähnlicher Enzyme) eingestellten Verdünner-Stammlösung angefeuchtet und bei $+37^{\circ}\text{C}$ bzw. 94% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Zusammensetzung der Verdünner-Stammlösung:

6,056	g Tris
3,400	g Zitronensäure
1,250	g Fruktose
168,000	ml Aqua dest.

(mit 1 n NaOH auf pH 8,1 eingestellt)

Um eine gleichmäßige Durchfeuchtung des Substratfilms zu erreichen, wurde 1 Tropfen Stammlösung (ca. 0,05 ml) am Rande der Gelatinemembran aufpipettiert und mit einem Glasstab über die Filmfläche ausgerollt.

. . . . Auftragen der Spermien auf den Substratfilm

Nachdem das im Brutschrank vorinkubierte Ejakulat in einer auf pH 6,9 eingestellten Stammlösung des Tris-Verdünners suspendiert war (Verdünnung 1:100), erfolgte das Auftragen der Spermien auf die Filmmembran. Hierzu wurde 0,01 ml Spermasuspension am Rande des Filmquadrates aufpipettiert und mit einem Glasstab gleichmäßig die Substratfilmfläche ausgerollt. Pro Ejakulat wurden 3 Präparate angefertigt. Unmittelbar nach Auftragen der Samenzellen wurden die einzelnen Objektträger horizontal in einen Exsikkator (im Brutschrank bei $+37^{\circ}\text{C}$) zurückgelegt, der von wasserdampfgesättigter Preßluft durchströmt wurde. Durch Einleiten von 0,5 l Preßluft/Minute in ein, mit dem Exsikkator verbundenes Wassergefäß, konnte die relative Luftfeuchtigkeit bei 94% konstant gehalten werden (Abb. 3a). Zusätzlich wurde angefeuchtetes Filterpapier am Boden eingelegt. Nach einer Inku-

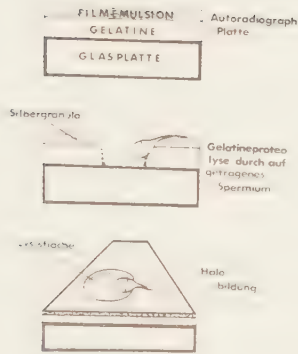


Abb. 3: Schematische Darstellung der Gelatineproteolyse von Spermien auf autoradiographischen Platten (Kodak AR-10). Die am Lysisrand liegenden Silbergranula ergeben unter dem Mikroskop einen scharfen Begrenzungsring.

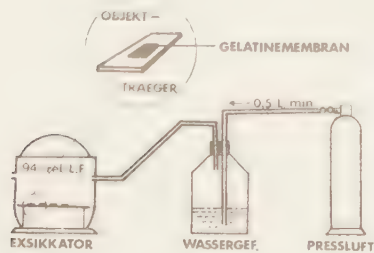


Abb. 3a: Versuchsanordnung zur Inkubation der Gelatinemembranen bei $+37^{\circ}\text{C}$ und 94% relativer Luftfeuchtigkeit. Luftumwälzung: 0,5 Ltr./min.

bationszeit von 4 Stunden konnten die Filmstrips aus dem Brutschrank genommen und ausgewertet werden.

3.2.2.5. Auswertung der Lysiszonen

Auf jedem der 3 pro Ejakulat angefertigten Präparate wurde mit einem Okularmikrometer, bei 500facher Vergrößerung, der Lysiskreisdurchmesser ($2r$) von je 50 Spermien vermessen. In die statistische Auswertung gingen die Flächen ($F = r^2 \pi$) der Auflösungszone ein. Für die Bestimmung des prozentualen Anteiles der Spermien mit Lysisreaktion wurden pro Filmmembran 100, also je Ejakulat 300 Samenzellen ausgezählt.

3.2.3. Überprüfung der Spezifität der Gelatinesubstratfilm-Methode

Um die proteolytische Wirkung von Akrosin auf Gelatinesubstratfilm zu objektivieren, wurden folgende Vorversuche durchgeführt:

- a) Bei drei Bullenejakulaten erfolgte die Enzymextraktion nach der in 3.2.1.1. beschriebenen Methode mit 2%iger Essigsäure (pH 2,6). Der saure Ansatz wurde nach Extraktion mit Tris-Verdünner auf pH 6,9 umgestellt und die Spermatozoen auf 15 Substratfilme aufgetragen. Die Lysisreaktion wurde nach 4-stündiger Bebrütung im Brutschrank (37°C; 94% relative Luftfeuchte) mit einer Kontrollgruppe (frische, unbehandelte Spermien) verglichen.
- b) Um die Hemmwirkung eines spezifischen Protease-Inhibitors (gereinigter Seminalplasma-Inhibitor vom Eber = SPI) auf die proteolytische Akrosinaktivität zu überprüfen, wurde das Inkubationsmedium der Filmmembranen kurz vor Gebrauch mit 0,1 - 1,0 mg SPI^{*}/1 ml Tris-Stammlösung (pH 8,1) angesetzt. Das Auftragen der Spermatozoen und der Inhibitor-Verdünner-Lösung erfolgte wie oben. Die Lysisreaktion der

* Der gereinigte Seminalplasma-Inhibitor wurde freundlicherweise von Dr. H. FRITZ und Mitarbeitern, Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Spermien wurde nach 1,5,10,20 Minuten und anschließend in 10-Minuten-Abständen über 4 Stunden beobachtet, Reaktionszeit und Lysiskreisfläche notiert und gegen die Kontrollgruppe (ohne Inhibitor) auf insgesamt 30 Filmstrips ausgemessen.

- c) Auf insgesamt 30 Gelatinesubstratfilmen wurde die Lysisfläche von gewaschenen und ungewaschenen Spermatozoen verglichen. Für den Waschvorgang wurde je 1 ml Sperma von 3 Ejakulaten 20 Minuten bei 600g und $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, das Seminalplasma dekantiert und das Sediment 2-6 mal 10 Minuten zentrifugiert bzw. in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Anschließend erfolgte das Auftragen gewaschener und ungewaschener Spermatozoen auf die Filmmembranen. Nach 4-stündiger Inkubation wurden die Lysisflächen der unterschiedlich behandelten Spermengruppen errechnet und einander gegenübergestellt.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Statistische Auswertung (Überblick)

Die in Tabelle 14 bis 18 angegebenen Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten wurden im Rechenzentrum der Technischen Hochschule München aufgestellt. Alle weiteren Berechnungen erfolgten mit einem Gerät (Combitron S) der Firma Diehl, München.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse orientierte sich nach den von MUDRA (1958), WEBER (1972) sowie ADAM und Mitarbeitern (1971) veröffentlichten Grundlagen.

Prozent- oder Nullwerte der Versuchsdaten wurden, mit Ausnahme der in Tabelle 6 aufgeführten, prozentualen Mißbildungsraten bei Spermien, grundsätzlich transformiert ($\text{arc. sin. bzw. } \lg x$). Bei ungleichen Gruppengrößen der Absolutwerte wurden die jeweiligen Konfidenzintervalle mit dem Scheffé-Test abgesichert (ADAM und Mitarbeiter, 1971); bei gleichen Gruppengrößen erfolgte die Überprüfung der Differenzen mit dem Tukey-Test (WEBER, 1972).

Im folgenden sind Parameter, statistische Auswertungsmethoden und Testsysteme der eigenen Ergebnisse zusammengefaßt dargestellt:

Parameter	Stat. Methoden	Testsystem	Transformation
Lysisfläche einzelner Spermien - Akrosinakt. der Spermienpopulation (Abb. 14-18a)	Korrelation Regression	F-Test t-Test	-
Akrosinakt. innerhalb u. zwischen den Grp. A,B und C (Tab. 4)	Varianzanalyse	F-Test Scheffé-Test	-
Lysisfläche einz. Spermien auf Gelatine innerh. u. zwischen den Grp. A,B und C (Tab. 5)	Varianzanalyse	F-Test Scheffé-Test	-
Prozent. Lysisreakt. auf Gelatine - Prozent ungefärbte Zellen bei Vitalfärbung (Tab. 7; Abb. 13)	Varianzanalyse Korrelation Regression	F-Test t-Test	arc.sin.
Prozent prim. Mißbild. (Einteil. in Klassen) - Akrosinakt. zwischen den Klassen (Tab. 6)	Varianzanalyse	F-Test	-
Akrosinakt. gelagerter Spermien innerhalb u. zwischen den Gruppen A,B und C (Tab.8,10,11)	Varianzanalyse	F-Test Scheffé-Test	$x' = \lg(x+100)$
Lysisfläche einzelner, gelagerter Spermien innerhalb und zwischen den Gruppen A,B und C (Tab. 12 und 13)	Varianzanalyse	F-Test Tukey-Test	$x' = \lg(x+100)$
Glyzerinanteil - Akrosinakt. bei gelagerten Spermien (Tab. 9)	Varianzanalyse	F-Test	arc.sin.
Einfluß der Lagerzeit auf die Akrosinaktivität der Spermienpopulation (Tab. 9)	Varianzanalyse	F-Test	arc.sin.

3.3.2. Abhängigkeit der extrahierbaren Akrosinaktivität vom pH-Wert und der Extraktionsdauer

Die Extraktion gewaschener, sedimentierter Bullenspermien mit 2%iger Essigsäure ergibt weder im pH-Bereich von 2,1 bis 2,2 noch bei Ansäuerung auf pH 3,0 meßbare Akrosinaktivitäten im Akrosomenextrakt. Maximale Enzymmengen konnten erst nach Einstellung des Extraktionsmediums auf pH 2,5 bis 2,7 ermittelt werden (Tab. 1). Darüberhinaus zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Extraktionszeit der Spermien und Akrosinaktivität des jeweiligen Akrosomenextraktes. Wurden nämlich die Spermiesedimente über 30 Minuten lang, länger als von SCHILL (1973 a) und FINK und Mitarbeitern (1972 a) angegeben, mit Essigsäure (pH 2,6) inkubiert, so stieg die Akrosinaktivität der jeweiligen Extrakte in den ersten 180 Minuten auf ein Maximum an, das in den Enzymansätzen über 48 Stunden unverändert blieb (Tab. 2). Obgleich ein Anstieg der extrahierbaren Akrosinaktivität nach längerer Spermienextraktion nur bei einem der untersuchten Ejakulate statistisch gesichert werden konnte ($P \leq 0,01$), wurden die angesäuerten Sedimente der Samenzellen bei weiteren Enzymbestimmungen mindestens 3 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ stehengelassen und erst dann zur Gewinnung des Akrosomenextrakts zentrifugiert.

3.3.3. Gelatineproteolyse von Bullenspermien

3.3.3.1. Vorversuche zur Methodik

Die von GADDUM-ROSSE und BLANDAU (1972) beschriebene Methode zum Nachweis proteolytischer Reaktion von Säugerspermien auf Gelatinemembranen erwies sich als nicht reproduzierbar. Das Auftragen verflüssigter Gelatine auf Objektträger, nach dem von ihnen angegebenen Verfahren, ergab nach dem Erstarren der Gelatinemembranen eine unterschiedliche Schichtdicke. Fixieren der Membranen mit

Tab. 1: Akrosinaktivität (in mU/10⁸Spermien) nach Extraktion von 10 Spermiesedimenten aus 2 Bullenejakulaten mit 2%iger Essigsäure bei verschiedenen pH-Werten (pH 2,0 bis 3,0)
Extraktionsdauer bei den einzelnen Sedimenten: 3 Stunden

SPERMAMENGE (ml)	n	pH-WERT DER ESSIGSÄURE	AKROSINAKTIVITÄT		F-WERT	BULLE (Nr.)
			$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$		
1	5	2,2	keine Aktivität!			52
1	5	2,4	32,6	1,6		52
1	5	2,6	336,4	8,3		52
1	5	,8	139,4	2,4		52
1	5	3,0	keine Aktivität!		<u>914,7</u> **	
1	5	.,1	keine Aktivität!			53
1	5	.,5	69,4	1,2		53
1	5	.,	168,7	3,5		53
1	5	.,	165,5	5,3		53
1	5	.,	136,2	2,2	<u>289,4</u> **	53

n Anzahl der Parallelmessungen/Spermiesediment mit dem kombinierten BAAE/ADH-Testsystem

F-Wert: Signifikanz der Differenzen innerhalb der Gruppe zwischen den Akrosinaktivitäten bei verschiedenen pH-Werten

** $P \leq 0,01$

Tab. 2: Akrosinaktivität (in mU/10⁸ Spermien) nach zunehmender Extraktionsdauer der Spermensedimente mit 2%iger Essigsäure (pH 2,6)

EXTRAKTIONS- DAUER	AKROSINAKTIVITÄT											
	Bulle 53				Bulle 45				Bulle 50			
	$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	n		$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	n		$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	n	
30'	481,8	3,8	5		167,5	2,1	5		309,7	3,6	5	
60'	485,3	8,1	5		177,7	0,8	5		305,3	5,1	5	
120'	505,1	5,6	5		180,2	0,9	5		323,6	5,1	5	
180'	511,9	4,5	5		183,6	1,4	5		322,9	6,1	5	
24 ^h	500,2	10,2	5		183,0	1,8	5		319,0	8,3	5	
48 ^h	500,8	7,1	5		181,8	1,5	5		319,5	3,2	5	

Signifikanz des Aktivitätsanstiegs:

Bulle 53: $P \geq 0,05$ ($F = 1,85$)

Bulle 45: $P \leq 0,01$ ($F = 16,60^*$)

Bulle 50: $P \geq 0,05$ ($F = 1,81$)

n = Anzahl der Parallelmessungen

Veronalacetat führte teilweise zur Auskristallisation des Puffers, wodurch die Gelatineschicht beschädigt oder unbrauchbar wurde. Auch das Auftrageverfahren der Spermatozoen nach Art des Blutausriches brachte unbefriedigende Ergebnisse. Die Spermien reagierten nur an wenigen Stellen der Substratmembran. Als besonders ungünstig erwies sich die vorgeschlagene Inkubationsmethode: Die notwendige Wasserdampfsättigung für die Inkubation der Sperma-Gelatine-Präparate in Petrischalen konnte nicht konstant gehalten werden. Dadurch differierten Lysisbeginn und Lysisintensität bei Spermien der gleichen Probe. Aus diesen Gründen wurde für den Nachweis der gelatinolytischen Wirkung von Bullenspermien ein nach PENN und Mitarbeitern (1972) modifiziertes Verfahren benutzt, das die oben erwähnten methodischen Fehler ausschloß und in hohem Maße standardisiert werden konnte. Die Modifikation war auf folgende Verfahrensschritte beschränkt: Zum Auftragen der Spermatozoen auf die Gelatinemembran wurde die Spermien suspension mit einem Glasstab über die Filmfläche ausgerollt. Das von PENN und Mitarbeitern (1972) beschriebene Verfahren des "Aufbürstens" der Spermien hatte bei eigenen Untersuchungen den Nachteil, daß nicht alle Zellen gleichzeitig in direkten Kontakt mit der Substratoberfläche kamen. Sie "schwammen" zunächst in der Suspension über der Gelatineschicht und setzten sich erst nach einiger Zeit auf der Filmoberfläche ab. Daher reagierten solche Spermien später als andere Zellen, die unmittelbar nach Applikation direkt auf der Substratschicht zu liegen kamen. Das "Einrollen" der Spermien in die Filmemulsion lieferte bessere Ergebnisse.

Im Gegensatz zu PENN und Mitarbeitern (1972), die spermienbeschichtete Filmmembranen in wasserdampfhaltigen Petrischalen inkubierten, wurden bei der eigenen Versuchsanordnung die Präparate in einem, von gesättigtem Wasserdampf durchströmten Exsikkator gelagert (Abb. 3 a). Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftumwälzung blieben bei dieser Anordnung während der Inkubation annähernd konstant.

Wurden die entstandenen Lysisflächen der Spermien unter einem Phasenkontrastmikroskop ausgewertet, so waren die Auflösungshöfe, im Gegensatz zur Untersuchung mit dem normalen Lichtmikroskop, unscharf und von dunklen Lichtringen überdeckt (Abb. 4). Die Depolymerisationsflächen sind daher ohne Phasenkontrasteinstellung (Abb. 5) bestimmt worden.



Abb. 4: Lysisfläche von Bullenspermien
(Phasenkontrast; 250fache Ver-
größerung)



Abb. 5: Lysisfläche von Bullenspermien
(Durchlichtverfahren; 250fache
Vergrößerung)

3.3.3.3. Ablauf der Lysisreaktion bei Bullenspermien auf Gelatinesubstratfilmen

Nachdem ca. 0,1 ml Sperma und die mit Tris-Stammlösung (pH 8,1) angefeuchteten Gelatinemembranen 30 Minuten lang bei +37°C im Brutschrank getrennt vorinkubiert waren, erfolgte das Auftragen der Spermiesuspension auf die Filmplättchen. Hierzu wurde die Suspension mit einem Glasstab auf der Gelatineschicht ausgerollt und die Präparate anschließend in den wasserdampfhaltigen Exsikkator zurückgelegt. Die Objektträger wurden in gewissen Zeitabständen kurz aus dem Brutschrank herausgenommen, um Beginn, Ablauf und Ende der Lysisreaktion zu beobachten.

Unter dem Lichtmikroskop zeigten sich erste Andeutungen der Gelatineauflösung innerhalb von 30 bis 60 Sekunden nach Auftragen der Spermatozoen. Im Bereich des Äquatorialen Segments der Akrosomen begann, meist asymmetrisch, die Aufschwemmung der Silbergranula aus der Filmemulsion. Die ursprünglich dunkelbraune Filmfarbe wechselte in helles Ocker (Abb. 6). Die Depolymerisationszone breitete sich rasch um den lateralen und apikalen Kopfkappenteil aus (Abb. 7 und 8). Bereits nach 10 Minuten war der gesamte vordere Akrosomenabschnitt der Spermien von einem hellen, mondartigen Hof umschlossen, der innerhalb einer Stunde an Größe zunahm (Abb. 9). Am äußeren Rand der Lysiskreise setzten sich die freigeordneten Silberkörnchen der Filmemulsion ab und bildeten einen scharfen, kontrastreichen Begrenzungsring. Bei besonders intensiv reagierenden Samenzellen kam das Mittelstück und der vordere Schwanzabschnitt in den Auflösungshof zu liegen. Nach ca. 4 - 6 Stunden war die maximale Kreisfläche erreicht (bis zu $2500 \mu\text{m}^2$ /Spermium).

Wurden die Spermatozoen über diese Inkubationszeit hinaus auf der Gelatinemembran belassen, so kam es zur Auflösung des gesamten Akrosoms. Dabei blieben zunächst die Akrosomenmembranen im Bereich des Äquatorialsegments intakt. Schließlich löste sich aber die gesamte Membranstruktur der Kopfkappe auf (Abb. 10 und 11).



Abb. 6: Gelatineproteolyse von Bullenspermien. Beginnende Reaktion im Bereich des lateralen Akrosoms (Äquatorialssegment). 400-fache Vergrößerung.



Abb. 7: Ausbreitung der Gelatineproteolyse über den apikalen Rand des Akrosoms von Bullenspermien (400-fache Vergrößerung).



Abb. 8: Entwicklung der Gelatineproteolyse von Bullenspermien im akrosomalen Abschnitt (400-fache Vergrößerung).



Abb. 9: Lysisreaktion von Bullenspermien nach 4-stündiger Inkubation der Gelatine-Sperma-Präparate (400-fache Vergrößerung).

Die teilweise auf der Akrosomenhülle liegenden Silbergranula wurden im Verlauf der Membranzerstörung frei und verteilten sich diffus in der Lysisfläche. Eine weitere Zunahme der Auflösungsfläche wurde zu diesem Zeitpunkt der Reaktion nicht mehr beobachtet.

8.8.8.8. Vergleich der Lysisflächen von gewaschenen und ungewaschenen Bullenspermien auf Gelatinemembranen

GADDUM und BLANDAU (1970, 1972) sowie andere Autoren (ALLEN und Mitarbeiter, 1973; PENITTE-BRINLESCA und VELAZQUEZ-MESA, 1972) benutzten zur Demonstration der Gelatineproteolyse von Säugetierspermien nur gewaschene oder epididymale Samenzellen. Ihrer Ansicht nach wird die proteolytische Aktivität ungewaschener Spermien durch Inhibitoren aus dem Seminalplasma gehemmt. Dies wurde im Vorversuch überprüft (Tab. 3). Die Lysisflächen ungewaschener Spermatozoen waren zwar durchschnittlich kleiner, unterschieden sich aber nicht vom mittlern Flächeninhalt der Reaktionskreise gewaschener Samenzellen ($P \geq 0,05$). Die Anzahl der Waschvorgänge mit physiologischer Kochsalzlösung (2 - 6 mal) beeinflusste das Ergebnis nicht. Daher wurden für weitere Gelatinosubstratfilm-Versuche ausschließlich frische, ungewaschene Spermien verwendet. Unter anderem sollte dadurch verhindert werden, daß es bereits beim Waschvorgang zu Membranveränderungen der Akrosomen und damit zu verfälschten Ergebnissen kommen kann.

8.8.8.9. Überprüfung der Akrosinaktivität auf Gelatine

Gelatine gilt als heterogenes, unspezifisches Substrat für verschiedene Proteasen (BERGSTRÖM, 1970). Daher wurde überprüft, inwieweit die Lysiewirkung von Bullenspermien auf Gelatinemembranen allein durch Akrosin verursacht wird oder ob andere proteolytische Spermienenzyme daran beteiligt sind.

- a) Die Spermiesedimente von 3 Bullenejakulaten wurden in jeweils 2%iger Essigsäure (pH 2,6) suspendiert und 30 Minuten lang extrahiert. Dadurch dürften etwa 95% der Akrosinaktivität aus den Spermatozoen verloren gegangen sein (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 a). Nach Umstellung des sauren Ansatzes mit Tris-Stammlösung auf pH 6,9 wurde die enzymextrahierte Spermiesuspension auf Gelatinemembranen aufgetragen und die Lysisreaktion nach 4-stündiger Bebrütung (Brutschrank; +37°C; 94% relative Luftfeuchtigkeit) mit der proteolytischen Reaktion von Kontrollspermien (unbehandelt) verglichen. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war keines der extrahierten Spermien aktiv; die "Halo"-Bildung blieb aus.
- b) Ein aus Seminalplasma von Ebern rein gewonnener Protease-Inhibitor wurde mit dem Inkubationsmedium der Filmmembran (Tris-Stammlösung, pH 8,1) kurz vor Gebrauch vermischt (Konzentration der Inhibitor-Trislösung: 1,0 bis 0,1 mg SPI/ml Tris-Stammlösung). Nach Vorinkubation der Gelatinemembranen mit diesem Gemisch (30 Minuten) erfolgte das Auftragen der Spermien. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 1,0 - 0,5 mg/ml konnte die Lysisreaktion der Samenzellen völlig gehemmt werden. 0,4 bis 0,1 mg Inhibitor pro ml Tris-Stammlösung führte zu einer stark eingeschränkten Gelatinelysis. Im Gegensatz zur völligen Auflösung bei Kontrollspermien (ohne Inhibitor) wurde die Gelatineschicht allerdings nicht vollständig durchbrochen; die inhibitorhaltigen Spermien zeigten lediglich schwache Aufhellungszonen im Akrosomenbereich (Abb. 12).

Tab. 3: Vergleich der Lysisfläche (in μm^2 /Spermium bei 150 ausgewerteten Samenzellen/Ejakulat) von gewaschenen und ungewaschenen Spermien aus 10 Ejakulaten von 3 Bullen.

Waschvorgang: Zentrifugation der Spermproben bei 600 g (jeweils 10 Minuten) und Resuspension in physiologischer Kochsalz-Lösung. Die Gelatine-Sperma-Präparate wurden 30 Minuten lang inkubiert und anschließend 4 Stunden bei $+37^\circ\text{C}$ und 94% relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet.

VORBEREITUNG der Spermien	MITTELWERT IN μm^2 $\bar{x}$	STANDARDABWEICHUNG $\pm s_x$	ANZAHL n	F-WERT	BULLEN
ungewaschen	375,4	26,9	5		50
2x gewaschen	415,6	19,9	5	1,41 n.s.	50
ungewaschen	365,8	31,3	5		45
4x gewaschen	397,0	23,4	5	0,64 n.s.	45
ungewaschen	868,6	40,4	5		52
6x gewaschen	910,0	30,2	5	0,67 n.s.	52

n = Anzahl der ausgewerteten Gelatinemembranen

n.s. = nicht signifikante Differenz



Abb. 10: Gelatineproteolyse von Bullenspermien nach 6-stündiger Inkubation. Der Äquatorialbereich des Akrosoms ist noch vorhanden. Die Silbergranula lösen sich von den Membranen ab (800-fache Vergrößerung).



Abb. 11: Nach 8-stündiger Inkubation der Bullenspermien auf Gelatine beginnt sich die Akrosomenstruktur aufzulösen (800-fache Vergrößerung).



Abb. 12: Lysisreaktion von Bullenspermien nach 30 Minuten langer Inkubation der Gelatinemembranen mit Seminalplasma-inhibitor-Lösung (0,3mg/ml). Die Spermien zeigen nur schwache proteolytische Aktivität (vergleiche Abb. . . . Gelatinemembranen ohne Inhibitor). 400-fache Vergrößerung.

3.3.4. Deckbeanspruchung und Akrosinaktivität

3.3.4.1. Auswirkungen unterschiedlicher Ejakulationsfrequenz auf die Akrosinaktivität der Spermienpopulation/Ejakulat

Wie bereits erwähnt wurden die Versuchsbullen unterschiedlich oft zur Spermagewinnung herangezogen.

Bullen der Gruppe A: Spermagewinnung 5mal täglich (innerhalb einer Stunde) über 4 Wochen (jeweils Montag mit Freitag)

Bullen der Gruppe B: Spermagewinnung 2mal wöchentlich in 2 - 3tägigen Abständen über 4 Wochen

Bullen der Gruppe C: 3malige Spermagewinnung innerhalb von 6 Wochen im Abstand von 14 Tagen

Bei jedem gewonnenen Ejakulat wurde die Akrosinaktivität unmittelbar nach Desemination photometrisch aus 1 ml Sperma bestimmt. Der akrosinhaltige Akrosomenextrakt dieser Spermaprobe wurde in 5 Küvettenansätze (kombiniertes BAEE/ADH-Testsystem) einpipettiert und gegen einen Leerwert (nur substrathaltig, ohne Akrosin) gemessen. Unter Berücksichtigung der Spermiedichte und der Ansatzverdünnung (Zusatz von Essigsäure in ml/Spermiesediment) ließ sich die Akrosinaktivität von jeweils 10^8 Spermien/Ejakulat errechnen. Der Mittelwert aus 5 Parallelmessungen/Akrosomenextrakt ging in die statistische Auswertung ein.

Beispiel: Einsatzmenge = 1 ml Sperma pro Ejakulat

Nach mehrmaligem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung bzw. zentrifugieren und extrahieren des Spermiesediments mit 2%iger Essigsäure (pH 2,6) erhielt man den enzymhaltigen Akrosomenextrakt. Davon wurden im kombinierten Testsystem eingesetzt:

1. Küvette: 0,01 ml; daraus errechnete Aktivität: 256,5
mU/ 10^8
Spermien

2. Küvette: " ; " " : 259,7

3. Kuvette: 0,01 ml; Akrosinaktivität/10 ⁸ Spermien:		259,7 mU
4. Kuvette: "	"	: 256,5 mU
5. Kuvette: "	"	: 253,3 mU
Der daraus errechnete Mittelwert beträgt 257,1 mU		

Die Standardabweichung blieb im allgemeinen äußerst niedrig; im oben aufgeführten Beispiel beträgt sie $\pm 2,71$.

Alle im weiteren Verlauf dieser Arbeit zitierten Akrosinaktivitäten stellen den Durchschnittswert sämtlicher Ejakulate pro Versuchszeitraum und Bulle dar.

Die Akrosinaktivitäten wurden sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen A, B und C verglichen und die entsprechenden Differenzen statistisch abgesichert (Tab. 4).

Die Aktivitäten von Spermien aus Ejakulaten der Versuchsserien differierten, mit Ausnahme der Bullen 1 zu 5 bzw. 2 zu 9 (in Tabelle 4), nicht signifikant. Wurden jedoch die Differenzen der Enzymaktivitäten gruppenweise errechnet, so unterschied sich die Gruppe A (Bullen mit 5x täglicher Deckbeanspruchung) hochsignifikant von Gruppe B (Bullen mit 2x wöchentlicher Deckbeanspruchung). Die Akrosinaktivitäten der Spermien aus 56 Ejakulaten von 3 Bullen, die 5mal täglich deseminiert wurden, waren bei jedem dieser Tiere wesentlich ($P \leq 0,01$) niedriger (entsprechende Werte: 261,1; 403,9; 307,0 mU/10⁸Spermien) als die ermittelten Enzymaktivitäten aus Spermien der insgesamt 6 Bullen, von denen weniger oft (2x wöchentlich bzw. 2x monatlich) Sperma gewonnen wurde (entsprechende Werte: 436,9; 647,9; 615,5 bzw. 425,1; 450,5; 740,7 mU/10⁸Spermien). Die Differenz der Gruppe A zu C konnte allerdings nicht statistisch gesichert werden.

Tab. 4: Vergleich der photometrisch ermittelten Akrosinaktivität (in mU/10⁸Spermien) aus Spermien von Bullenejakulaten innerhalb und zwischen den Gruppen A, B und C

GRUPPE	MITTELWERT/BULLE/VERSUCHSZEITRAUM		
	$\bar{x}$	$\pm s$	n
A	$\bar{x}_1$: 261,1	94,7	17
A	$\bar{x}_2$: 403,9	189,7	20
A	$\bar{x}_3$: 307,0	151,4	19
B	$\bar{x}_4$: 436,9	245,7	7
B	$\bar{x}_5$: 647,9	260,2	8
B	$\bar{x}_6$: 615,5	132,1	8
C	$\bar{x}_7$: 425,1	120,1	3
C	$\bar{x}_8$: 450,5	17,9	3
C	$\bar{x}_9$: 740,3	412,3	3

FG_{gesamt}: 88
 MQ_{Fehler}: 32496,2
 F: 6,56**
 * P<0,05: 2,05
 ** P<0,01: 2,74

n = Anzahl der gewonnenen Ejakulate/Versuchszeitraum

BERECHNUNG DER KONFIDENZINTERVALLE FÜR DIE DIFFERENZEN (Scheffé-Test)

$$L = \sum_{i=1}^k c_i \bar{x}_i \quad \sum_{i=1}^k \frac{c_i^2}{n_i} \quad \sqrt{s^2 MQI \sum_{i=1}^k \frac{c_i^2}{n_i}} \quad \text{Signifikanz}$$

$$\begin{array}{llll} \bar{x}_1 - \bar{x}_5: & -386,8 & 0,1838 & 361,8 \\ \bar{x}_2 - \bar{x}_9: & -336,4 & 0,3859 & 325,6 \\ H_0: A - B: & -244,7 & 0,0543 & 208,8 \\ H_1: B - C: & 33,8 & 0,1545 & 331,7 \\ H_2: A - C: & 210,9 & 0,1289 & 303,0 \end{array}$$

$$H_0 = \text{Hypothese}_0 = \frac{n_1 \bar{x}_1 + n_2 \bar{x}_2 + n_3 \bar{x}_3}{n_1 + n_2 + n_3} - \frac{n_4 \bar{x}_4 + n_5 \bar{x}_5 + n_6 \bar{x}_6}{n_4 + n_5 + n_6} = A - B$$

H₁ = Hypothese₁ = B - C

H₂ = Hypothese₂ = A - C

L = linearer Kontrast

k = Anzahl der i Gruppen vom Umfang n_i

c_i = (k - 1) F(α; k-1; n-k)

MQI = Fehlervarianz

... Konstante 1,0

3.3.4.2. Auswirkungen unterschiedlicher Ejakulationsfrequenz auf die Gelatineproteolyse einzelner Spermien von Bullenejakulaten

Die durchschnittliche Lysisfläche einzelner Spermien auf Gelatinemembranen wurde pro Ejakulat und Bulle folgendenmaßen ermittelt:

Beispiel: Neben 1 ml Sperma/Ejakulat für die photometrische Akrosinbestimmung wurde 0,1 ml vom gleichen Sperma für das Gelatinesubstratfilm-Verfahren in Tris-Stammlösung (pH 6,9) suspendiert und nach 30 Minuten langer Vorinkubation im Brutschrank (+37°C) auf 3 Gelatinemembranen aufgetragen. Nach 4-stündiger Bebrütung wurden die entstandenen Lysisflächen von 50 Spermien/Filmmembran ausgewertet:

1. Membran:	durchschnittl. Lysisfläche/Spermium	
		= 635 μm^2
2. Membran:	" "	= 682 μm^2
3. Membran:	" "	= 706 μm^2
Mittelwert aus 150 gemessenen Lysisfl.		= <u>674 μm^2</u>

Von 2 Bullen jeder Gruppe (A, B und C) lagen also folgende Daten aus den untersuchten Ejakulaten vor:

- Akrosinaktivität aus 10^8 Spermien/Ejakulat
- Durchschnittliche Lysisfläche/Spermium aus 150 Spermien pro Ejakulat

Aus technischen Gründen fielen in der ersten Versuchsserie je ein Bulle der Gruppe A, B und C für den Parallelvergleich der Akrosinaktivität mit der Lysisfläche aus. Die verwendete autoradiographische Stripping-Platte hatte ungleiche Schichtdicke und lieferte daher inkonstante Ergebnisse. Außerdem war nicht immer die Auswertung von 3 Filmmembranen möglich (Beschädigung der Gelatineschicht). In diesen Fällen wurden die Lysishöfe von 100 Spermien pro Ejakulat bestimmt (Abb. 14 bis 18a; Tab. 5).

Die durchschnittliche Lysisfläche der Spermien sämtlicher Ejakulate eines Versuchszeitraumes wurde analog zu den

Tab. 5: Vergleich der proteolytischen Akrosinaktivität (in $\mu\text{m}^2/\text{Spermium}$ bei 100 ausgewerteten Samenzellen) auf Gelatinemembranen von einzelnen Spermien aus Bullen-ejakulaten innerhalb und zwischen den Gruppen A, B und C

GRUPPE MITTELWERT/BULLE/VERSUCHSZEITRAUM

	$\bar{x}$	$\pm s$	n	
A	738,5	294,4	56	FG _{gesamt} : 161
A	545,8	204,0	48	MQ _{Fehler} : 93574,5
B	965,7	492,4	23	F: 8,14*
B	872,3	313,6	18	P $\leq$ 0,05 : 2,27
C	585,1	217,8	8	P $\leq$ 0,01 : 3,14
C	944,5	251,3	8	

n = Anzahl der ausgewerteten Gelatinemembranen/Bulle

BERECHNUNG DER KONFIDENZINTERVALLE FÜR DIE DIFFERENZEN (Scheffé-Test)

$L = \sum_{i=1}^k c_i \bar{x}_i$	$\sum_{i=1}^k \frac{c_i^2}{n_i}$	$\sqrt{S^2 \text{MQI} \sum_{i=1}^k \frac{c_i^2}{n_i}}$	Signifikanz
$x_2 - x_3: -419,8$	0,0642	261,1 (307,1)	**
$x_2 - x_4: -326,5$	0,0763	284,7 (334,8)	*
$x_2 - x_6: -398,6$	0,1458	393,5 (462,8)	*
$H_0: A-B: -275,1$	0,0339	189,7 (223,1)	**
$H_1: B-C: 159,9$	0,0868	303,6 (357,1)	-
$H_2: A-C: -115,2$	0,0721	276,2 (326,6)	-

H = Hypothese

k = Anzahl der i Gruppen vom Umfang n_i

S^2 (k-1) F(α ; k-1; n-k)

MQI Fehlervarianz

c_i = Konstante 1,0

photometrischen Meßdaten varianzanalytisch ausgewertet (Tab. 4).

Es ergaben sich überraschende Parallelen zu den Gruppendifferenzen der photometrisch ermittelten Akrosinaktivitäten. Auch auf Gelatinemembranen war die durchschnittliche Lysisfläche der Spermien von Bullen, die 5 mal täglich deseminiert wurden wesentlich ($P \leq 0,01$) niedriger (entsprechender Durchschnittswert in $\mu\text{m}^2/\text{Spermium}$: 738,5; 545,8) als bei Samenzellen von Tieren, die 2 mal wöchentlich bzw. 3 mal innerhalb von 6 Wochen zur Spermagewinnung herangezogen wurden (entsprechende Durchschnittswerte in $\mu\text{m}^2/\text{Spermium}$: 965,7; 872,3 bzw. 585,1; 944,5). Die Gruppendifferenzen konnten statistisch gesichert werden.

Die häufige Ejakulationsfrequenz von Bullen der Gruppe A resultierte demnach nicht nur in einer Erniedrigung der extrahierbaren Akrosinaktivität des Gesamtejakulats, sondern führte außerdem zu einer geringeren Lysisfläche einzelner Spermien dieser Tiere auf Gelatinemembranen. Demgegenüber scheint sich eine von der Norm abweichende Ejakulationsfrequenz mit längeren Deckintervallen (2x monatlich) nicht auf die Akrosinaktivität der Spermienpopulation bzw. einzelner Samenzellen auszuwirken.

3.3.5. Spermienmorphologie und Akrosinaktivität

Bei den gewonnenen Ejakulaten wurde unmittelbar nach der Desemination neben der Enzymbestimmung die makroskopische und mikroskopische Spermabeurteilung durchgeführt. Da das trypsin-ähnliche Spermienenzym Akrosin im Akrosom lokalisiert ist, interessierte vor allem der Zusammenhang zwischen primären Mißbildungen und Akrosinaktivität der Samenzellen.

Nach Tuscheausstrich wurde aus jedem Ejakulat der prozentuale Anteil primär geschädigter Samenzellen bei 300 ausgezählten Spermien errechnet. Dieser Anteil variierte bei den 9 untersuchten Ejakulaten von 9 Versuchsbullen zwischen 0,0 und 11,5 Prozent (Tab. 6).

Die primären Mißbildungsarten der Spermien wurden pro Ejakulat und Versuchsbulle prozentual in insgesamt 7 Klassen eingeteilt.

Tab. 6: Überprüfung der Abhängigkeit der Akrosinaktivität (in mU/10⁸ Spermien) zum prozentualen Anteil primärer Mißbildungen/Ejakulat (8 Versuchsbullen; 82 Ejakulate)

ANZAHL DER EJAKULATE	PRIM. MIßBILD./EJAKULAT (in Prozent von - bis)	DURCHSCHNITTliche AKROSINAKTIVITÄT	
		$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$
14	0,0 - 0,9	358,0	71,4
14	1,0 - 1,9	467,8	65,1
20	2,0 - 2,9	468,4	42,4
13	3,0 - 3,9	382,2	53,7
7	4,0 - 4,9	446,7	87,9
7	5,0 - 5,9	328,6	60,9
7	6,0 - 11,3	299,3	62,5

Tabelle zur Varianzanalyse:

	FG	SQ	MQ	F	
Gruppe	6	304.194,8	50.699,1	<u>1,09</u>	P ≥ 0,05
Fehler	75	3.473.920,9	46.318,9		

Die Klassenbreite der ersten 6 Klassen (primäre Mißbildungen: 0,0 - 5,9%) betrug 1 Prozent, die der 7. Klasse 5,3 Prozent. Die durchschnittlichen Akrosinaktivitäten/Klassen wurden einander gegenüber gestellt und die jeweiligen Differenzen mit Hilfe der Varianzanalyse statistisch ausgewertet.

Die Enzymaktivität bei unterschiedlichem Anteil der Spermien mit echten Mißbildungen pro Ejakulat unterschied sich nicht. Obwohl bei 6,0 bis 11,3 Prozent primären Mißbildungen/Ejakulat eine geringe Abnahme der extrahierbaren Akrosinaktivität festzustellen war, ist es unwahrscheinlich, daß die übliche, morphologische Spermienbeurteilung (Tuscheausstrich) für objektive Aussagen über das akrosomale System geeignet ist.

Da nicht zu erwarten war, daß andere Kriterien der makroskopischen und mikroskopischen Spermauntersuchung (beispielsweise Motilität, Farbe, Konsistenz, pH-Wert) mit der extrahierbaren Akrosinaktivität in Zusammenhang stehen, wurde ein statistischer Vergleich dieser Parameter mit den enzymatischen Meßwerten bewußt unterlassen. Sie sollten nur als zusätzliche Kontrolldaten zur Verfügung stehen.

Sowohl die Anfärbbarkeit bei Vitalfärbung als auch die extrahierbare Akrosinaktivität dürften weitgehend vom Membranzustand der Spermien abhängig sein. Als besonders empfindliches Testverfahren eignet sich in dieser Hinsicht die Gelatinesubstratfilm-Methode. Bei jedem untersuchten Ejakulat wurde daher eine Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau durchgeführt und der prozentuale Anteil ungefärbter Zellen aus 300 Spermien pro Ausstrich bestimmt. Parallel hierzu erfolgte bei 300 Spermien/Ejakulat die Auswertung des durchschnittlichen Prozentsatzes aktiver, lysisbildender Samenfäden. Die jeweiligen, prozentualen Anteile ungefärbter Spermien bei Vitalfärbung und aktiver Zellen auf Gelatinemembranen korrelierten hochsignifikant (Abb. 13). Der Korrelationskoeffizient ($r = +0,83$) wurde statistisch gesichert ($P \leq 0,01$). Dies bedeutet, daß über den Anteil "lebender" Samenzellen/Ejakulat Rückschlüsse auf die Anzahl lysisbildender Spermien auf Gelatinefilmen gezogen werden können (Regressionskoeffizient: $b = 0,24$; $s.e. = 0,04$).

Tab. 7: Vergleich des prozentualen Anteils lysisbildender Spermien auf Gelatinemembranen (500 ausgewertete Spermien pro Ejakulat) mit dem Anteil ungefärbter Zellen bei Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau (Anteil aus 300 ausgewerteten Zellen/Ejakulat in Prozent)
(Prozentwerte transformiert in arc. sin.)

GRUPPE	BULLE	n	LYSISBILD.SPERMIEN (Gel.)		UNGEF.ZELLEN(Färbung)	
			$\bar{x}_l$	$\pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x}_f$	$\pm s_{\bar{x}}$
A	48	20	57,0	1,1	11,8	2,1
A	52	18	54,0	1,8	19,2	2,8
B	44	8	68,4	1,1	22,2	1,1
B	47	7	67,8	1,3	26,2	2,2
C	50+51	6	63,6	1,0	22,2	1,1

Signifikanz der Differenzen von $\bar{x}_l - \bar{x}_f$:

Gruppe	Bulle	Differenz von $\bar{x}_l - \bar{x}_f$	F-Wert	Signifikanz
A	48	5,4	3,29	-
A	52	5,0	1,58	.
B	44	9,9	14,11	* *
B	47	11,6	16,22	* *
C	50+51	9,4	9,61	*

n = Anzahl der untersuchten Ejakulate

$\bar{x}_l$ = Mittelwerte des prozentualen Anteils lysisbildender Spermien auf Gelatinemembranen

$\bar{x}_f$ = Mittelwerte des prozentualen Anteils ungefärbter Zellen bei Vitalfärbung mit Bromphenolblau

Während bei Bullen, die 5x täglich deseminert wurden, der Prozentsatz lebender und lysisbildender Spermien annähernd identisch war ($P \geq 0,05$), lag bei Tieren mit längeren Deckintervallen die prozentuale Lysisreaktion auf Gelatinemembranen durchschnittlich höher (Gruppe B: $P \leq 0,01$; Gruppe C: $P \leq 0,05$) als der Anteil "lebender" Spermien bei Bromphenolblau-Färbung (Tab. 7).

3.3.6. Korrelation zwischen Akrosinaktivität und Gelatineproteolyse von Bullenspermien

Bei jeweils 2 Bullen jeder Gruppe (A, B und C) wurde die extrahierbare, photometrisch ermittelte Akrosinaktivität aus 10^8 Spermien/Ejakulat in direkter Beziehung zu den durchschnittlichen Lysisflächen von 100 Spermien/Ejakulat gebracht.

Beispiel:

Durchschnittliche Akrosinaktivität der Spermien des gewonnenen Ejakulats: $x = 250,8 \text{ mU}/10^8 \text{ Spermien}$

Durchschnittliche Lysisfläche von 2x je 50 Spermien der

gleichen Probe: $y_1 = 327,1 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{Spermium}$

$y_2 = 365,7 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{Spermium}$

Auf diese Weise ließ sich bei 6 Versuchsbullen für alle Ejakulate des Versuchszeitraums die Korrelation bzw. Regression von x_1 (Akrosinaktivität von 10^8 Spermien pro Ejakulat) zu y_{11} und y_{12} (durchschnittliche Lysisfläche/Spermium bei je 50 Spermien auf 2 Gelatinemembranen) statistisch berechnen. Es ergab sich eine hochsignifikante, positive Korrelation zwischen den photometrisch ermittelten Akrosinaktivitäten der Gesamtejakulate und der durchschnittlichen Lysisfläche einzelner Spermatozoen (Abb. 14 - 18). Die Linearität der Funktion von x zu y_1 bzw. y_2 konnte in jedem Fall statistisch gesichert werden ($P \leq 0,01$ bzw. $P \leq 0,05$).

In Abb. 18a werden die Akrosinaktivitäten und die entsprechenden Lysisflächen der Spermien sämtlicher Ejakulate des Versuchszeitraumes und der Versuchstiere zusammenfassend dargestellt. Der Korrelationskoeffizient ($r = +0,83$; $P \leq 0,01$) verdeutlicht die Beziehung der biochemisch-analytisch ermittelten Akrosinaktivität des Gesamtejakulats zur proteolytischen Wir-

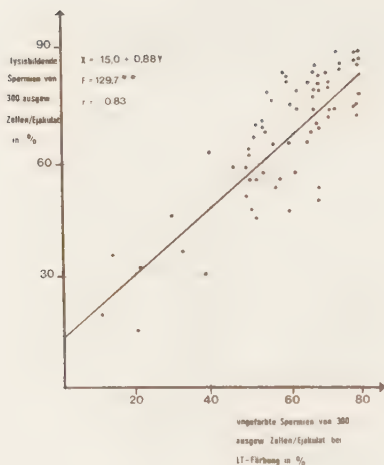


Abb. 13

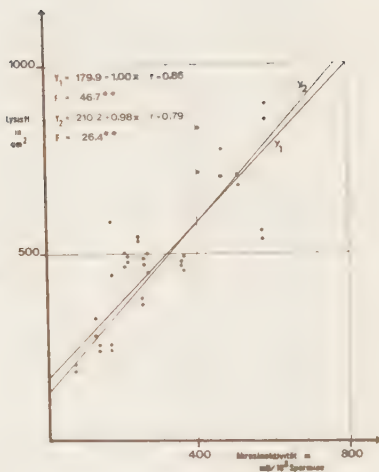


Abb. 14

Abb. 13: Graphische Darstellung der Regression des prozentualen Anteils lysisbildender Spermien auf Gelatinemembranen (y = lysisbildende Spermien/300 ausgewertete Samenzellen pro Ejakulat in Prozent) zum Anteil ungefärbter Spermien bei Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau (x = ungefärbte Zellen/Ejakulat/300 ausgewählte Spermien in Prozent).

Abb. 14: Eulle W. (Gruppe A). Graphische Darstellung der Regression von x (Akrosinaktivität in mU/10⁶Spermien) zu y_1 und y_2 (Lysisfläche in μm²/Spermium bei je 50 Spermien auf 2 Gelatinemembranen). Korrelationskoeffizient: $r = +0,86$ bzw. $+0,79$.

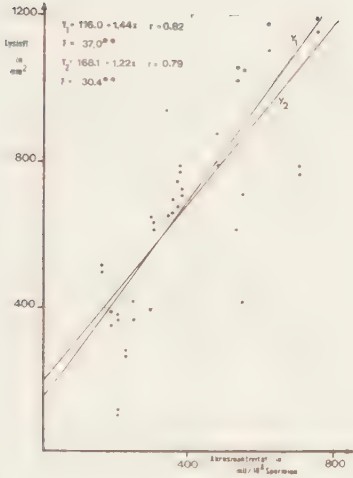


Abb. 15

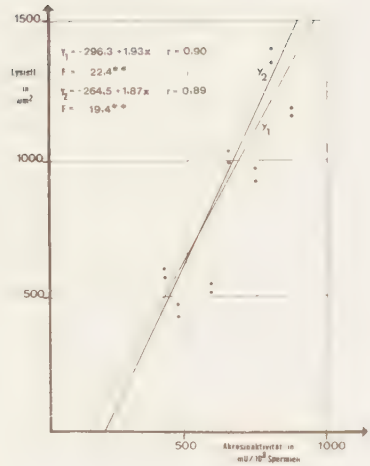


Abb. 16

Abb. 15: Bulle 48 (Gruppe A). Graphische Darstellung der Regression von x (Akrosinaktivität in mU/10⁸ Spermien) zu y₁ und y₂ (Lysisfläche in um²/Spermium bei je 50 Spermien auf 2 Gelatinemembranen). Korrelationskoeffizienten: r = +0,82 bzw. +0,79.

Abb. 16: Bulle 47 (Gruppe B). Graphische Darstellung der Regression von x (Akrosinaktivität in mU/10⁸ Spermien) zu y₁ und y₂ (Lysisfläche in um²/Spermium bei je 50 Spermien auf 2 Gelatinemembranen). Korrelationskoeffizienten: r = +0,90 bzw. +0,89.

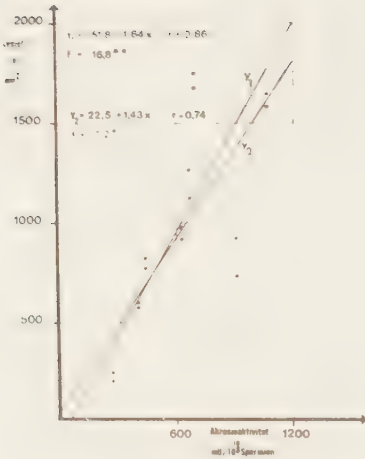


Abb. 17:

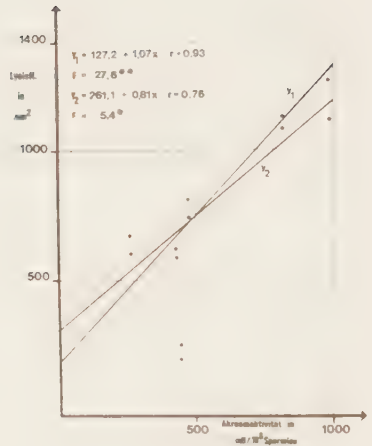


Abb. 18:

Abb. 17: Bullen 50 und 51 (Gruppe B). Graphische Darstellung der Regression von x (Akrosinaktivität in mU/10⁸Spermien) zu y₁ und y₂ (Lysisfläche in μm²/Spermium bei je 50 Spermien auf 2 Gelatinemembranen). Korrelationskoeffizienten: r = +0,86 bzw. +0,74.

Abb. 18: Bullen 50 und 51 (Gruppe C). Graphische Darstellung der Regression von x (Akrosinaktivität in mU/10⁸Spermien) zu y₁ und y₂ (Lysisfläche in μm²/Spermium bei je 50 Spermien auf 2 Gelatinemembranen). Korrelationskoeffizienten: r = +0,93 bzw. +0,76.

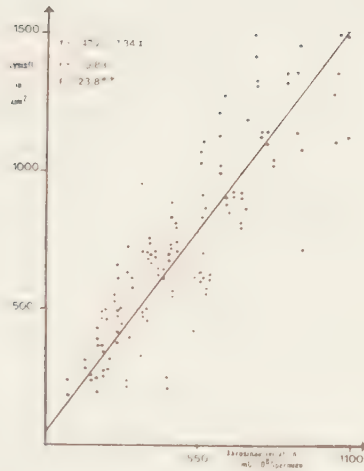


Abb. 18a: Bullen der Gruppen A, B und C. Graphische Darstellung der Regression von x (Akrosinaktivität in mU/100 Spermien) zu y (Lysisfläche in μm^2 /Spermium bei insgesamt 100 Spermien auf 2 Gelatinemembranen). Korrelationskoeffizient: $r = +0,83$.

kung einzelner Spermien auf Gelatine-Substratfilmen. Über die Lysisfläche einzelner Samenzellen kann man somit auf die extrahierbare Enzymaktivität der Spermienpopulation schließen. Darüberhinaus wird durch diese Zusammenhänge die Akrosinspezifität der Gelatineproteolyse (siehe 3.3.3.4.) zusätzlich abgesichert.

3.3.7. Akrosinaktivität nach Lagerung der Bullenspermien bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C

Je 1 ml von 20 Ejakulaten von Bullen der Gruppen A, B und C wurden unmittelbar nach der Gewinnung mit Tris-Stammlösung verdünnt und unter Zusatz von unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen (5 - 30%) über 4 bis 6 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C aufbewahrt. Weitere 27 Ejakulate wurden ohne Zusätze abgekühlt bzw. eingefroren.

Zweck des Versuches war, festzustellen, inwieweit sich die extrahierbare Akrosinaktivität von Spermienpopulationen im Verlauf der Spermalagerung bei tiefen, unphysiologischen Temperaturen ändert. Außerdem sollte überprüft werden, ob frisches Sperma unter derartigen Bedingungen über längere Zeit für die Bestimmung der Akrosinaktivität konserviert werden kann. Auf die Anwendung von Eidotter als Membranprotektivum wurde bewußt verzichtet. Da ein verfälschender Einfluß der fermenthaltigen Eisubstanzen auf die Gelatineproteolyse durch gelagerte Spermien nicht auszuschließen war und diese Zellen sowohl zur biochemischen als auch zur histochemischen (Gelatineverfahren) Enzymbestimmung benutzt wurden, waren zum Vergleich identische Lagerbedingungen Versuchsvoraussetzung.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 bis 11 wiedergegeben.

Für den varianzanalytischen Vergleich der Akrosinaktivität wurden die Spermaproben in folgenden Klassen zusammengefaßt:

- Akrosinaktivität von frischen Spermien (Nativsperma)
- " " bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagerten Spermien (mit glyzerinhaltigem Verdünner)
- " " bei -20°C gelagerten Spermien (mit glyzerinhaltigem Verdünner)

Die gleiche Klassenordnung galt für Spermien, die ohne Zusätze aufbewahrt wurden.

Innerhalb der Klassen lagen die Enzymwerte von Spermien aus Ejakulaten der Gruppe A (Bullen mit 5x täglicher Deckbeanspruchung) ausnahmslos unter den Akrosinaktivitäten der bei gleichen Bedingungen aufbewahrten Samenzellen aus Ejakulaten der Gruppe B und C (Bullen, die 2x wöchentlich bzw. 3 mal im Monat zur Spermagewinnung herangezogen wurden). Die Differenzen konnten allerdings nur bei gekühlt gelagerten Spermaportionen zwischen Tieren der Gruppe A und B statistisch gesichert werden ($P \leq 0,05$) (TAB. 10). Wurden jedoch die jeweiligen Abnahmen der Akrosinaktivität gegenüber dem Nativsperma nach Abkühlung bzw. Einfrieren untersucht, so zeigte sich, daß eine Lagerung der Spermien bei $+4^{\circ}\text{C}$ zu einer signifikanten, bei -20°C zu einer hochsignifikanten Aktivitätsabnahme gegenüber der Enzymaktivität frischer Spermatozoen führt.

Erstaunlicherweise unterschieden sich die Akrosinwerte von Spermien, die bei $+4^{\circ}\text{C}$ ohne Verdünner aufbewahrt wurden, nicht von dem Enzymgehalt frischer Samenzellen (TAB. 11). Dagegen konnte aus Spermaproben, die bei -20°C ohne Zusätze eingefroren wurden, kein Akrosin mehr extrahiert werden.

Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, sanken die Akrosinaktivitäten gelagerter, abgekühlter bzw. eingefrorener Spermien um 8,4 - 100 Prozent gegenüber dem Nativsperma ab. Nur bei 2 von 20 Ejakulaten war nach Lagerung der Samenzellen bei $+4^{\circ}\text{C}$ eine Erhöhung der Aktivität im Vergleich zu frischen Spermatozoen festzustellen (um 20,7 bzw. 44,8%).

Bei -20°C eingefrorene Zellen der Gruppe A schienen besonders empfindlich auf den Temperaturschock reagiert zu haben. Aus 7 Samenportionen dieser Bullen konnte nach dem Auftauen nur noch in einem Fall Akrosin nachgewiesen werden.

Lagerzeit (4 - 6 Tage) und Glyzerinkonzentration des Verdünners (5 - 40%) hatten auf die Akrosinaktivität der Spermien keinen Einfluß (TAB. 9).

Tab. 8: Zu- bzw. Abnahme der Akrosinaktivität (in mU/10⁸Spermien)
nach Lagerung der Ejakulate mit glyzerinhaltigem Ver-
dünner bei +4°C bzw. -20°C

GRUPPE BULLE		AKROSINAKTIVITÄT			GLY- ZERIN (%)	LAGER- ZEIT (Tage)
		frisch	+4°C	-20°C		
A	48	705,2	171,2 (- 75,7%)	0,0 (-100,0%)	5	6
A	48	533,8	374,0 (- 29,9%)	0,0 (-100,0%)	10	6
A	48	194,7	0,0 (-100,0%)	0,0 (-100,0%)	20	6
A	52	257,0	254,5 (- 1,1%)	0,0 (-100,0%)	10	4
A	52	584,3	96,6 (- 83,5%)	0,0 (-100,0%)	20	4
A	52	248,4	170,4 (- 31,4%)	205,1 (- 17,4%)	30	4
A	52	464,3	0,0 (-100,0%)	0,0 (-100,0%)	40	4
B	44	300,9	363,3 (+ 20,7%)	176,4 (- 41,4%)	5	6
B	44	470,9	681,8 (+ 44,8%)	227,3 (- 51,7%)	10	6
B	44	563,3	89,6 (- 84,1%)	76,6 (- 86,4%)	20	6
B	47	548,5	252,7 (- 53,9%)	167,0 (- 69,6%)	10	4
B	47	424,9	260,7 (- 38,6%)	228,7 (- 46,2%)	20	4
B	47	676,3	619,6 (- 8,4%)	538,6 (- 20,4%)	30	4
B	47	790,6	535,5 (- 32,3%)	0,0 (-100,0%)	40	4
C	50	464,5	301,9 (- 35,0%)	121,5 (- 73,8%)	5	6
C	50	456,7	336,1 (- 26,4%)	330,3 (- 27,7%)	10	6
C	50	430,3	384,4 (- 10,7%)	178,9 (- 58,4%)	20	6
C	51	1097,9	405,7 (- 63,7%)	134,3 (- 87,8%)	10	4
C	51	833,6	517,2 (- 38,0%)	364,1 (- 56,3%)	20	4
C	51	289,3	193,9 (- 33,0%)	0,0 (-100,0%)	30	4

Der Glyzerinanteil in % bezieht sich jeweils auf die Endkonzentration.

Tab. 9: Überprüfung der prozentualen Zu- bzw. Abnahme der Akrosinaktivität (in mU/10⁸ Spermien) nach Lagerung der Ejakulate mit glyzerinhaltigem Verdünner bei +4°C in Abhängigkeit vom Glyzerinanteil (Endkonzentration in %) und der Lagerzeit (in Tagen) (Prozentwerte transformiert in arc. sin.)

$\bar{x}$ = durchschnittliche Ab- bzw. Zunahme der Akrosinaktivität der bei +4°C gelagerten Ejakulate in Prozent gegenüber dem Ausgangswert (Akrosinaktivität frischer Ejakulate = 100%)

GLYZERINANTEIL n		ZU- BZW. ABNAHME DER AKROSINAKTIVITÄT in % (in %) (arc. sin.) gegenüber dem Ausgangswert			
		$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	F-Test	Signifik.
5	3	14,68	3,31	<u>1,18</u>	nicht sign.
10	6	16,04	1,69		
20	6	10,37	2,63		
30	3	15,93	0,82		

LAGERZEIT					
6 Tage	9	13,56	2,34	<u>0,07</u>	nicht sign.
4 Tage	11	12,79	1,57		

n = Anzahl der untersuchten Ejakulate

Tab. 10: Vergleich der photometrisch ermittelten Akrosinaktivität (in $\text{mU}/10^8$ Spermien) von frischen und gelagerten Ejakulaten (mit glyzerinhaltigem Verdünnser bei $+4^\circ\text{C}$ bzw. -20°C über 4 - 6 Tage) zwischen den Versuchsgruppen A, B und C

$\bar{x}$ = durchschnittliche Akrosinaktivität von n Ejakulaten, transformiert in $\lg(x + 100)$

GRUPPE BULLE n LAGERTEMPERATUR				AKROSINAKTIVITÄT		F-Test
				$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	
A	48	3	frisch	2,6217	0,1697	0,81 nicht sign.
A	52	4	frisch	2,5571	0,0943	
B	44	3	frisch	2,6340	0,0806	
B	47	4	frisch	2,7714	0,0574	
C	50	3	frisch	2,6534	0,0100	
C	51	3	frisch	2,8041	0,1740	
A	48	3	$+4^\circ\text{C}$	2,3697	0,3423	3,40* $P \leq 0,05$ signifikant
A	52	4	$+4^\circ\text{C}$	2,3187	0,1183	
B	44	3	$+4^\circ\text{C}$	2,8525	0,0970	
B	47	4	$+4^\circ\text{C}$	2,6911	0,0806	
C	50	3	$+4^\circ\text{C}$	2,6431	0,0223	
C	51	3	$+4^\circ\text{C}$	2,6659	0,0848	
A	48	3	-20°C	2,0000	-	2,07 nicht sign.
A	52	4	-20°C	2,1211	0,1208	
B	44	3	-20°C	2,4012	0,0793	
B	47	4	-20°C	2,4371	0,1664	
C	50	3	-20°C	2,4748	0,0842	
C	51	3	-20°C	2,3454	0,1928	

Berechnung der Konfidenzintervalle für die Akrosinaktivitäten nach Lagerung der Ejakulate bei $+4^\circ\text{C}$ zwischen den Gruppen A, B und C: (Scheffé-Test)

DIFFERENZEN/GRUPPE	$\sum_{i=1}^k \frac{c_i}{n_i}$	$\sqrt{S^2 \text{MQI} \cdot k \cdot \frac{c_i^2}{n_i}}$	Signif.	F
A - B: 0,4197	0,2856	0,3761	*	3,40*
A - C: 0,3146	0,3094	0,3914	-	
B - C: 0,1057	0,3094	0,3914	-	

k = Anzahl der i Gruppen vom Umfang n_i

S^2 = $(k-1) F(\alpha; k-1; n-k)$

MQI = Fehlervarianz

c_i = Konstante 1,0

Tab. 11: Vergleich der photometrisch ermittelten Akrosinaktivitäten (in mU/10⁸Spermien) frischer, bei +4°C und bei -20°C mit glyzerinhaltigem Verdünner gelagerter Ejakulate sowie von Spermaportionen, die ohne Verdünner bei +4°C aufbewahrt wurden
 $\bar{x}$ = durchschnittliche Akrosinaktivität von n Ejakulaten, transformiert in lg (x + 100)

LAGERTEMPERATUR n		AKROSINAKTIVITÄT			F-Test
(mit Verdünner)		$\bar{x}$	(Absolutwert)	$\pm s_{\bar{x}}$	
frisch	20	2,7636	(480,2)	0,0346	
+4°C	20	2,5816	(281,6)	0,0583	<u>20,05</u> **
-20°C	20	2,2948	(97,2)	0,0608	P≤0,01

(ohne Verdünner)					
frisch	9	2,6110	(308,3)	0,0608	1,12
+4°C	9	2,4659	(192,4)	0,1224	nicht sign.

Ejakulate, die bei -20°C ohne Verdünner gelagert wurden, zeigten in keinem Fall Enzymaktivität !

Berechnung der Grenzdifferenzen zwischen der Akrosinaktivität frischer, bei +4°C und bei -20°C gelagerter Ejakulate mit Verdünner: (Tukey-Test)

Grenzdifferenz für P≤0,05: 0,1765

Grenzdifferenz für P≤0,01: 0,2221

DIFFERENZEN	SIGNIFIKANZ
Akrosinakt. frisch - +4°C : 0,1820	*
Akrosinakt. frisch - -20°C: 0,4688	**
Akrosinakt. +4°C - -20°C: 0,2868	**

3.3.8. Lysisfläche einzelner Spermatozoen auf Gelatine nach Lagerung der Ejakulate bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C

Von den Spermien der in Abschnitt 6. untersuchten Ejakulate wurden, parallel zur biochemischen Akrosinbestimmung (kombiniertes BAEE/ADH-Testsystem), die auf Gelatinemembranen entstandenen Lysiskreise nach 4-stündiger Inkubation gemessen und ausgewertet (Tab. 12 und 13).

Pro Spermaportion (0,1 ml) wurden die Auflösungsflächen von je 50 Samenzellen auf 2 Filmmembranen bestimmt und der durchschnittliche Flächeninhalt den einzelnen Klassen (frische, bei $+4^{\circ}\text{C}$ und -20°C mit bzw. ohne Verdünner über 4 bis 6 Tage gelagerte Spermien) zugeordnet. Auch in diesem Versuchsteil wurden die Differenzen der mittleren Lysisflächen innerhalb und zwischen den Klassen mit Hilfe der Varianzanalyse statistisch überprüft.

Die Auflösungsflächen waren bei frischen bzw. bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit glyzerinhaltigem Verdünner gelagerten Spermien wesentlich größer als bei Samenzellen, die 4 bis 6 Tage lang bei -20°C mit gleichen Zusätzen aufbewahrt wurden ($P \leq 0,01$). Die Depolymerisationszonen von nativen und $+4^{\circ}\text{C}$ -Spermien unterschieden sich jedoch in ihrem Flächeninhalt nicht (Tab. 13). Demgegenüber entwickelten Samenzellen, die ohne glyzerinhaltigem Verdünner bei dieser Temperatur ($+4^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt wurden, deutlich kleinere Lysishöfe als frische Spermien derselben Spermaprobe. ($P \leq 0,01$). Völlig inaktiv waren Samenzellen, die ohne Verdünner bei -20°C gelagert wurden.

Da es sich bei den angegebenen Flächeninhalten um Durchschnittswerte handelt, muß erwähnt werden, daß bei gelagerten Spermien die Ausdehnung der Lysiszonen auffallend variierte. Neben überdurchschnittlich großen "Halos" wurden besonders kleine Lysishöfe auf den jeweiligen Substratmembranen beobachtet (Abb. 19 und 20). Ein Zusammenhang zwischen Beginn und Intensität der Lysisreaktion konnte ausgeschlossen werden, da die Gelatineproteolyse bei allen Spermien gleichzeitig einsetzte.



Abb. 19: Gelatineproteolyse der Spermien von Bullenejaculaten, die bei -20°C mit glyzerinhaltigem Verdünner über 4 - 6 Tage aufbewahrt wurden. Die unterschiedliche Lysis ist für derartig vorbehandelte Zellen charakteristisch. (400-fache Vergrößerung)



Abb. 20: Gelatineproteolyse der Spermien von Bullenejaculaten, die bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit glyzerinhaltigem Verdünner über 4 - 6 Tage gelagert wurden. Die Lysis entwickelt sich unterschiedlich (Vergleiche Abb. 9: frische Spermien). (400-fache Vergrößerung).

Tab. 12: Vergleich der Lysisfläche (in μm^2 /Spermium bei 150 ausgewerteten Zellen) von frischen, bei $+4^\circ\text{C}$ und -20°C mit glyzerinhaltigem Verdünner gelagerten Samenzellen nach Auftragen auf Gelatinemembranen

$\bar{x}$ = durchschnittliche Lysisfläche von je 150 Spermien aus n Ejakulaten (in μm^2)

$\bar{x}'$ = Lysisflächen transformiert in $\lg(x + 100)$, da Absolutwerte teilweise 0,0.

GRUPPE BULLE n LAGERTEMPERATUR				LYSISFLÄCHE SPERMIMUM	F-Test	
				$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$	
A	48	6	frisch	736,8	124,5	
A	52	8	frisch	636,0	72,9	
B	44	6	frisch	610,8	116,8	<u>1,70</u>
B	47	8	frisch	845,2	96,0	nicht
C	50	6	frisch	693,3	27,9	sign.
C	51	6	frisch	918,3	82,4	
				$\bar{x}'$		
A	48	6	+4°C	2,6049	0,1992	
A	52	8	+4°C	2,5532	0,1292	
B	44	6	+4°C	2,8440	0,1292	<u>1,37</u>
B	47	8	+4°C	2,8397	0,0574	nicht
C	50	6	+4°C	2,8746	0,1224	sign.
C	51	6	+4°C	2,8250	0,0616	
				$\bar{x}'$		
A	48	6	-20°C	2,0000	-	
A	52	8	-20°C	2,3889	0,1469	
B	44	6	-20°C	2,3788	0,1216	<u>1,52</u>
B	47	8	-20°C	2,4164	0,1571	nicht
C	50	6	-20°C	2,4619	0,1529	sign.
C	51	6	-20°C	2,4115	0,0900	

Tab. 13: Vergleich der Lysisfläche (in μm^2 /Spermium bei 150 ausgewerteten Zellen/Ejakulat) von frischen, bei $+4^\circ\text{C}$ und -20°C mit bzw. ohne glyzerinhaltigem Verdünner gelagerten Spermien

$\bar{x}$ = durchschnittliche Lysisfläche von Spermien aus n Ejakulaten, transformiert in $\lg(x + 100)$

LAGERTEMPERATUR (mit Verdünner)	n		LYSISFLÄCHE/SPERMIMUM (Absolutwert)	$\pm s_{\bar{x}}$	F-Test
frisch	6	2,9206	(733,0)	0,0608	
$+4^\circ\text{C}$	6	2,7568	(471,2)	0,0565	<u>30,57</u> **
-20°C	6	2,3429	(120,2)	0,0692	$P \leq 0,01$
(ohne Verdünner)					
frisch	6	nicht transf.	728,2	32,5	
$+4^\circ\text{C}$	6		335,1	12,9	<u>126,20</u> ** $P \leq 0,01$

Spermien, die bei -20°C ohne Verdünner gelagert wurden, entwickelten keine Gelatineproteolyse

Berechnung der Grenzdifferenzen zwischen den Lysisflächen frischer, bei $+4^\circ\text{C}$ und bei -20°C gelagerter Spermien (mit Verdünner): (Tukey-Test)

Grenzdifferenz für $P \leq 0,05$: 0,1974

Grenzdifferenz für $P \leq 0,01$: 0,2599

DIFFERENZEN	SIGNIFIKANZ
Lysisfläche frisch - $+4^\circ\text{C}$: 0,1637	-
Lysisfläche frisch - -20°C : 0,5777	**
Lysisfläche $+4^\circ\text{C}$ - -20°C : 0,4140	**

4. DISKUSSION

Im klinisch-diagnostischen Bereich beschränkt sich die Spermienbeurteilung von Bullenejakulaten im allgemeinen auf makroskopische, mikroskopische und chemisch-physikalische Untersuchungen der Samenzellen. Mikroskopische Beurteilungskriterien wie Dichtebestimmung, Motilitätsschätzung, Morphologie oder Vitalfärbung der Spermien, stehen im Vordergrund. Damit ist dem Kliniker die Möglichkeit gegeben, die Spermaquantität und -qualität annähernd zu objektivieren. Pathologische und physiologische Veränderungen der Samenzellen können größtenteils erkannt und ursächlich überprüft werden. Bis heute sind allerdings morphologische und enzymatische Alterationen im Bereich des Akrosoms mit üblichen Untersuchungsmethoden ungenügend zu erfassen. Jedoch reagiert gerade dieser Spermienabschnitt äußerst empfindlich auf physikalische und chemische Einflüsse (VERES und Mitarbeiter, 1972; WATSON und MARTIN, 1971; JONES, 1973a; SCHILL, 1973b). Durch bestimmte Färbemethoden (FAWCETT, 1970; MANN, 1964; WELLS und Mitarbeiter, 1970a) und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde beispielsweise bei Bullenspermien (VERES und Mitarbeiter, 1972; WATSON und MARTIN, 1971) nach Spermaverdünnung (VERES und Mitarbeiter, 1972), -fixation (JONES, 1973a; SAACKE und MARSHALL, 1968) oder Tiefgefrieren (VERES und Mitarbeiter, 1972) eine Schädigung der Akrosomen beobachtet, die zur Zerstörung der Membranen und zum Verlust des akrosomalen Inhalts führte. VERES und Mitarbeiter (1972) stellten in ihrer Arbeit heraus, daß derartige Akrosomenveränderungen selbst unter dem Elektronenmikroskop nicht immer einwandfrei zu erkennen sind.

Da das Akrosom von Bullen- und anderen Säugetierspermien eine reichhaltige Enzymausstattung besitzt (ALLISON, 1967; ALLISON und HARTREE, 1969), lag es nahe, nicht nur morphologische, sondern auch enzymatische Veränderungen am Akrosom nach bestimmten äußeren und inneren Einwirkungen zu untersuchen. Diese Möglichkeit bot sich an, nachdem aus den

Spermien Enzyme isoliert werden konnten, die unmittelbar bei der Befruchtung beteiligt und ausschließlich im Akrosom lokalisiert sind (LEWIS und KETCHEL, 1971; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1970b, 1973a; FRITZ und Mitarbeiter, 1971; HO und MEIZEL, 1970; MULTAMÄKI und NIEMI, 1969; POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972a; STAMBAUGH und BUCKLEY, 1972). Die Protease Akrosin schien dafür besonders geeignet zu sein. Erstens konnte dieses Enzym bei Eber und Mensch unter Verwendung größerer Spermamengen bereits rein dargestellt und charakterisiert werden (FINK und Mitarbeiter, 1972a; FRITZ und Mitarbeiter, 1972b); zweitens spielt es als Schlüsselenzym bei der Befruchtung des Ovums eine entscheidende Rolle (FRITZ und Mitarbeiter, 1971), und drittens entwickelten FRITZ und Mitarbeiter (1972a) und andere (FINK und Mitarbeiter, 1972a; SCHILL, 1973a) ein Verfahren, mit dem es möglich wurde, die Akrosinbestimmung nicht nur in großen Mengen "gepoolten" Spermias, sondern auch im Einzelejakulat durchzuführen.

SCHILL (1973a) sowie SCHIRREN und EWEIS (1973) setzten erstmals die akrosomale Enzymbestimmung in Ergänzung zur morphologischen Spermienbeurteilung von Ejakulaten beim Mann ein.

Bei Bullenspermien wurden Untersuchungen dieser Art noch nicht durchgeführt. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, festzustellen, inwieweit sich einige innere und äußere Einflüsse auf das enzymatische Akrosomensystem auswirken. Als Indikator galt die extrahierbare Akrosinaktivität der Spermienpopulation sowie die Gelatineproteolyse einzelner Samenzellen. Als Parameter für physiologische, innere Einflüsse auf den morphologischen bzw. enzymatischen Zustand der Akrosomen von Bullenspermien wurde der Spermienaufenthalt im Nebenhoden benutzt. Um unphysiologische, äußere Einwirkungen auf den Akrosomenkomplex zu überprüfen, wurden die Spermatozoen bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C mit und ohne Membranprotektiva aufbewahrt. Darüberhinaus sollte ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität einzelner Spermien und der Spermienpopulation untersucht werden.

Zur Akrosinbestimmung aus der Spermienpopulation wurde das von FRITZ und Mitarbeitern (1972a) sowie von SCHILL (1973a) bei Eber und Mensch beschriebene kombinierte Testverfahren benutzt. Die saure Enzymextraktion aus Spermiesedimenten von Bullen erfolgte bei pH 2,6. FINK und Mitarbeiter (1972a) sowie KLENNER (unveröffentlicht) konnten aus Eberspermien auch unter pH-Werten von 2,5-2,6 verhältnismäßig hohe Akrosinaktivitäten ermitteln. Dies war bei Bullenspermien nicht möglich. Es ist anzunehmen, daß in pH-Bereichen unter 2,4 das Akrosin von Bullenspermien zerstört wird und daher im Akrosomenextrakt nicht mehr nachzuweisen ist. Die akrosomale Protease scheint bei dieser Tierart weniger stabil gegen Säure zu sein als beim Eber. Allerdings wurde nach Ansäuerung auf pH 2,7-3,0 ebenfalls nur geringe Enzymaktivität im Akrosomenextrakt von Bullensperma gefunden. Bei höherem pH-Wert der Extraktionslösung werden die akrosomalen Membranen wahrscheinlich nicht vollständig durchlässig oder die Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes ist im höheren pH-Bereich eingeschränkt.

SCHILL (1973a) empfahl, die Spermiesedimente von Humansperma 30 Minuten lang mit Essigsäure zu extrahieren. Längere Extraktionsdauer hatte keine weitere Erhöhung der Akrosinaktivität in den Akrosomenextrakten zur Folge. Wurden Bullenspermien in 2%iger Essigsäure (pH 2,6) angesetzt, so konnte nach 3-stündiger Extraktion durchschnittlich mehr Akrosinaktivität im Akrosomenextrakt gefunden werden als nach 30, 60 oder 120 Minuten. Dieser Zusammenhang zwischen Extraktionsdauer und extrahierbarer Akrosinaktivität könnte auf relativ größere Widerstandsfähigkeit der Membranen von Bullenspermien (JONES, 1973a; WATSON und MARTIN, 1971) gegenüber konzentrierten Lösungen zurückzuführen sein. Dadurch kann die Enzymextraktion aus dem Akrosom bei relativ kurzer Einwirkung des Extraktionsmediums (2%ige Essigsäure, pH 2,6) erschwert sein.

Diese Resultate deuten darauf hin, daß die extrahierbare Akrosinaktivität der Spermienpopulation/Ejakulat wesentlich

vom Membranzustand der Akrosomen abhängig ist. In jüngster Zeit wird allerdings auch die Möglichkeit einer Proenzymaktivierung diskutiert (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 b; SCHILL, 1973 a).

Da Gelatine ein heterogenes Substrat für verschiedene Proteasen darstellt (BERGSTRÖM, 1970), mußte die Spezifität der proteolytischen Wirkung des Akrosins auf Gelatinemembranen überprüft werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen läßt sich folgern, daß ausschließlich diese Protease für die Gelatinedepolymerisation durch Bullenspermien verantwortlich ist. Diese Aussage basiert auf folgenden Resultaten:

- a) Zwischen extrahierbarer Akrosinaktivität aus der Spermienpopulation und der Lysise Wirkung einzelner Samenzellen dergleichen Spermaprobe (Abb. 18 a) besteht eine deutliche Korrelation ($r = +0,83$; $P \leq 0,01$).
- b) Die Inkubation der Gelatinemembranen mit einem gereinigten Seminalplasma-Inhibitor aus Ebersperma, einem äusserst starken Akrosinhemmer (FRITZ und Mitarbeiter, 1972 f), kann die Proteolyse durch Bullenspermien verhindern. Da die biochemischen Eigenschaften von Akrosin aus Bullenspermien mit denen der akrosomalen Protease aus Eberspermien übereinstimmen (MULTAMÄKI und MIKKO, 1972), wurde das Akrosin der Bullenspermien durch den Inhibitor aus Eberseminalplasma maskiert und die Proteolyse gehemmt.
- c) Nach essigsaurer Akrosinextraktion aus Bullenspermien bleibt die Substratproteolyse durch derartig vorbehandelte Samenzellen aus.

Die akrosinspezifische, proteolytische Wirkung auf Gelatine, wie sie von anderen Autoren bereits vermutet wurde (PENN und Mitarbeiter, 1972; GADDUM-ROSSE und BLANDAU, 1972; ALLEN und Mitarbeiter, 1973; GADDUM und BLANDAU, 1970; BENITEZ-BRIBIESCA und VELAZQUEZ-MEZA, 1972), dürfte durch diese Ergebnisse ausreichend dokumentiert sein.

Da die akrosomale Protease wahrscheinlich mit der inneren Akrosomenmembran verbunden ist (FAWCETT, 1970; KOEHLER, 1972; STAMBAUGH und BUCKLEY, 1972), kann daraus geschlossen werden,

daß eine Reihe von Membranreaktionen notwendig sind, bevor der akrosomale Inhalt herausgelöst werden kann (PENN und Mitarbeiter, 1972). Bei der photometrischen Akrosinbestimmung geschieht dies durch Zerstörung der Akrosomenhüllen mit Essigsäure (FINK und Mitarbeiter, 1972a). Im weiblichen Genitaltrakt kommt es, wie BEDFORD (1969) und andere (FRANKLIN und Mitarbeiter, 1970; Austin, 1969; YANAGIMACHI und NODA, 1972a) vermuten, im Verlauf der Kapazitation bzw. Akrosomenreaktion zur Vesikulation der Plasma- und äußeren Akrosomenmembran und in unmittelbarer Nähe des Eies zum Verlust des Akrosoms; der akrosomale Inhalt wird herausgelöst. Ähnliche Vorgänge sind bei Akrosomen von Spermien in vitro beobachtet worden, die in künstlichen Kapazitationsmedien inkubiert wurden (ERICSSON und BUTHALA, 1970; JONES, 1973a; YANAGIMACHI, 1972b). Auch auf Gelatinemembranen kann Akrosin wahrscheinlich erst aus den Spermienakrosomen austreten, nachdem bestimmte Membranveränderungen abgelaufen sind. Diese Membranalterationen werden entweder durch Wasserdampf während der Inkubation oder durch Spermaverdünnung vor Auftragen der Samenzellen auf die Gelatineschicht verursacht. Dafür spricht die Tatsache, daß die Zellen nur in wasserdampfgesättigter Atmosphäre reagieren (BENITEZ-BRIBIESCA und VELAZQUEZ-MEZA, 1972; GADDUM und BLANDAU, 1970; ALLEN und Mitarbeiter, 1973; GADDUM-ROSSE und BLANDAU, 1972; PENN und Mitarbeiter, 1972) und Membranbeschädigungen bereits bei der Spermaverdünnung auftreten können (VERES und Mitarbeiter, 1972). Die Ablösung des Enzyms auf Gelatinesubstrat ist somit von einer degenerativen Veränderung am Akrosom abhängig (ALLEN und Mitarbeiter, 1973). Eventuell entsprechen diese Alterationen der von BEDFORD (1969) beschriebenen "falschen", unphysiologischen Akrosomenreaktion, die als degenerative Erscheinung bei epididymalen, ejakulierten und kapazitierten Goldhamster-spermien in vitro beobachtet wurde und durch Ablösung der gesamten Membranstruktur vor dem Äquatoralsegment gekennzeichnet ist. Das Äquatoralsegment selbst bleibt jedoch meist erhalten (ERICSSON und BUTHALA, 1970; FAWCETT, 1970;

FRANKLIN und Mitarbeiter, 1970; NICANDER und BANE, 1966). Es ist sogar bei toten oder gealterten Bullenspermien noch deutlich zu erkennen (FAWCETT, 1970). FAWCETT (1970) vermutet daher, daß die zur Auflösung der Zona pellucida des Ovums notwendigen Enzyme auf der inneren Akrosomenmembran oder am äquatorialen Segment von Bullenspermien lokalisiert sind. Interessanterweise heften sich die Spermien von Schaf und Eber mit diesem Akrosomenabschnitt erstmals an die Zona pellucida an (DICKMANN, 1965).

Da die Lysisreaktion von Bullenspermatozoen auf Gelatine am äquatorialen Teil des Akrosoms beginnt, sind Parallelen zu den Aussagen der oben genannten Autoren (ERICSSON und RUTHALA, 1970; FAWCETT, 1970; FRANKLIN und Mitarbeiter, 1970; NICANDER und BANE, 1966; BEDFORD, 1969; DICKMANN, 1965) wahrscheinlich nicht zufällig.

Zur Demonstration des Lysiseffektes von Säugetierspermien auf Gelatinemembranen wurden meist gewaschene oder epididymale Samenzellen benutzt (GADDUM und BLANDAU, 1970; ALLEN und Mitarbeiter, 1973; GADDUM-ROSCHE und BLANDAU, 1972; BENITEZ-BRIBIESCA und VELAZQUEZ-MEZA, 1972). ALLEN und Mitarbeiter (1973) stellten fest, daß die Lysisreaktion dieser Samenzellen durch Zugabe von Seminalplasma auf die Substratmembran deutlich eingeschränkt werden konnte. Obwohl bei den Versuchen von PENN und Mitarbeitern (1972) neben epididymalen auch ejakulierte, seminalplasmaumgebene Spermien benutzt worden sind, fand der Autor keine Unterschiede in den entstandenen Lysisflächen. Gewaschene, also seminalplasmafreie Spermatozoen entwickelten gleiche Lysisflächen wie ungewaschene Zellen. Eigene Beobachtungen (Tab.3) stimmen mit diesen Ergebnissen überein. Die scheinbar widersprüchlichen Aussagen von ALLEN und Mitarbeitern (1973) sowie PENN und Mitarbeitern (1972) können folgendermaßen erklärt werden: Untersuchungen von HIRSCHHAUSER und BAUDNER (1972) und SCHILL (unveröffentlicht) zeigen, daß Seminalplasma-Trypsin-Inhibitor-Antikörper und damit die Inhibitoren selbst, bei in vitro Versuchen an die äußere Kopfkapfenmembran von Menschengpermien gebunden werden. Akrosin,

das wahrscheinlich auf der inneren Akrosomenmembran lokalisiert ist (FAWCETT, 1970; KOEHLER, 1972; STAMBAUGH und BUCKLEY, 1972), wird daher bei intakten Akrosomenhüllen durch die Plasmamembran und die äußere akrosomale Membran vom Inhibitor abgeschirmt. ZANEVELD und Mitarbeiter (1973c) vermuten, daß im weiblichen Genitaltrakt unter diesen Umständen erst dann eine Komplexbildung zwischen Akrosin und Inhibitor möglich wird, wenn im Verlauf der "echten" Akrosomenreaktion die "trennenden" Membranen durchlässig werden und die Protease mit dem Hemmer in Kontakt kommt. Auf den Gelatinemembranen ist jedoch, wie oben bereits erwähnt, eine "falsche" Akrosomenreaktion wahrscheinlicher; die "echte" Akrosomenreaktion wurde nur bei kapazitierten Spermien in unmittelbarer Einähe beobachtet (BEDFORD, 1969). Da Plasma und äußere Akrosomenmembran bei der unphysiologischen Reaktion als gesamte Einheit von der Kopfkappe abgehoben werden, bleiben die Seminalplasma-Inhibitoren auf den abgestoßenen Hüllen gebunden, sodaß Akrosin ungehindert vor dem Äquatorialsegment austreten und mit der umgebenden Gelatine reagieren kann. Wird aber Seminalplasma unmittelbar nach Applikation der Spermien auf die Gelatineschicht aufgetragen, so liegen bereits alterierte Akrosomenmembranen vor. Die ungebundenen Inhibitoren des Seminalplasmas können somit in das Akrosom eindringen und einen großen Akrosinanteil maskieren. Die Lysise Wirkung dieser Spermien wird dadurch deutlich eingeschränkt. Diese Vermutungen werden durch Untersuchungen von PENN und Mitarbeitern (1972) verstärkt: TLCK, ein synthetisch hergestellter Trypsininhibitor, konnte erst dann eine Lysisreaktion epididymaler Spermien auf Gelatinefilmen hemmen, wenn er in die Gelatinemembran eingeschlossen war. Die Inhibitorpartikel kamen dadurch bei der Gelatineauflösung durch Akrosin rasch mit der Protease in Kontakt; die Depolymerisation wurde verhindert. Setzte man jedoch die aufzutragende Spermien suspension mit dem Inhibitor an, so zeigte sich keine Hemmwirkung. TLCK wurde wahrscheinlich an die Spermienmembranen ge-

bunden. Nach Auftragen der Spermatozoen auf Gelatine konnte Akrosin ungehindert aus dem Akrosom austreten.

Beobachtungen dieser Art machen es unwahrscheinlich, daß synthetische Trypsininhibitoren, wie ZANEVELD und Mitarbeiter (1973c) vermuten, auf Grund ihres niedrigen Molekulargewichts intakte Akrosomenmembranen passieren können und mit Akrosin einen irreversiblen Komplex bilden. Eventuell müssen die Membranen vorher derart zerstört werden, daß die innere Akrosomenhülle und somit Akrosin ungeschützt offenliegt. Im weiblichen Genitaltrakt sind Veränderungen dieser Art im Verlauf der echten Akrosomenreaktion beschrieben worden (BEDFORD, 1969).

Da bei eigenen Versuchen die zum Gelatineproteolysenachweis verwendeten Spermien vor Auftragen 1:100 verdünnt wurden, besteht allerdings neben der oben aufgestellten Hypothese die Möglichkeit, daß der geringe Seminalplasmaanteil in der aufgetragenen Spermasuspension sehr wenig Inhibitor enthielt und die proteolytische Wirkung von Akrosin dadurch nicht oder nur schwach gehemmt wurde. Angaben über die verwendete Spermamenge bzw. -verdünnung fehlen in den Veröffentlichungen anderer Autoren. Ein Vergleich mit eigenen Ergebnissen ist somit nicht gegeben.

Wie bereits erwähnt, reagiert der Akrosomenkomplex von Bullenspermien auf bestimmte Spermamanipulationen mit morphologischen Veränderungen. Spermatiefgefrierung und -verdünnung (VERES und Mitarbeiter, 1972; WATSON und MARTIN, 1971), Fixieren der Samenzellen (JONES, 1973a) und tiefe Lagertemperaturen (CHURCH und GRAVES, 1973; SALISBURY und VANDEMARK, 1961) führten zu Schädigungen der Akrosomenmembranen und teilweise zum Verlust des akrosomalen Inhalts. Darüber hinaus fanden WELLS und Mitarbeiter (1970a, 1970b) nach längerem Nebenhodenaufenthalt der Spermien in vivo morphologische Akrosomveränderungen. Bullen, die erst nach längerer Deckpause zur Spermagewinnung herangezogen wurden, wiesen im Ejakulat einen überdurchschnittlichen Anteil (bis 42%) von Samenzellen auf, deren akrosomale Membran verdickt oder rufuriert waren. Wurden die gleichen Tiere anschließend häufiger deseminiert, so sank der Prozentsatz von Spermatozoen mit veränderten Akrosomen innerhalb kurzer Zeit auf ein Minimum ab (WELLS und Mit-

arbeiter, 1970a, 1970b).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob sich akrosomale Alterationen dieser Art auch auf das enzymatische Akrosomensystem auswirken. Da sich die Gelatinesubstratfilmmethode gleichermaßen als Indikator für morphologische und enzymatische Akrosomenveränderungen eignet, wurden die Akrosinbestimmungen sowohl am Gesamtejakulat, als auch am einzelnen Spermium durchgeführt. Durch unterschiedliche Deckbeanspruchung der Versuchsbullen konnte der Spermienaufenthalt im Nebenhoden in gewissen Grenzen variiert werden. Dabei ändert sich weniger die Dauer der Nebenhodenpassage, für die beim Bullen ca. 8 - 10 Tage angegeben werden, als das Durchschnittsalter ejakulierter Spermien (KOEFOED-JOHNSON, 1960). Selbst durch hohe Ejakulationsfrequenz (bis 20 mal täglich) wird die epididymale Spermienreserve nicht erschöpft (JOHNSON und Mitarbeiter, 1970). Es ist aber anzunehmen, daß bei häufiger Deckbeanspruchung der Bullen ein überdurchschnittlicher Anteil von Samenzellen nur kurze Zeit im Nebenhoden lagert, wogegen bei seltener Spermagewinnung verhältnismäßig große Mengen "alter" Spermien im Ejakulat zu finden sind.

Eine 5xtägliche Desemination resultierte in einer Erniedrigung der extrahierbaren Akrosinaktivität aus 10^8 Spermien/Ejakulat sowie einer Abnahme der durchschnittlichen Lysisfläche von einzelnen Spermatozoen auf Gelatinesubstratfilmen gegenüber den Samenzellen von Bullen, die nur 2x wöchentlich bzw. 2 mal im Monat zur Spermagewinnung herangezogen wurden (TAB. 4 und 5). Die Differenzen waren jeweils signifikant ($P < 0,01$). Es muß daher angenommen werden, daß sich die unterschiedliche Deckbeanspruchung auf die extrahierbare Akrosinaktivität der Spermien ausgewirkt hat. Werden die Ergebnisse von WELLS und Mitarbeitern (1970a, 1970b) zum Vergleich mit den eigenen Resultaten herangezogen, so zeigen sich Parallelen zwischen morphologischen und enzymatischen Akrosomenveränderungen nach unterschiedlicher Nebenhodenaufent-

haltsdauer der Spermien: Der Anteil veränderter Akrosomenmembranen war, wie die Ergebnisse von WELLS und Mitarbeitern (1970a) zeigen, bei Spermien, die nur kurze Zeit im Nebenhoden lagerten (einen Tag) relativ gering (ca. 5%). Gleichermassen war die extrahierbare Akrosinaktivität bei Spermien von Bullen, die im eigenen Versuch häufig (5x täglich) deseminiert wurden, niedriger als bei Samenzellen von Tieren die längere Deckpausen hatten. Ein längerer Nebenhodenaufenthalt der Spermien resultiert, nach Aussage von WELLS und Mitarbeitern (1970a), in einem erhöhten Prozentsatz alterierter Akrosomen. Der Autor benutzte zum Nachweis der morphologisch veränderten Kopfkappen spezielle Anfärbemethoden. Die morphologischen Spermienuntersuchungen mit dem üblichen Verfahren (Tuscheausstrich) haben bei den eigenen Resultaten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Deckbeanspruchung der Versuchstiere und dem Anteil veränderter Samenzellen ergeben (Tab. 6). Es muß angenommen werden, daß aus Spermien von Ejakulaten der Gruppe A (Bullen mit 5x täglicher Deckbeanspruchung) aus relativ intakten, widerstandsfähigen Membranen weniger Enzym extrahiert werden konnte als aus Samenzellen von Ejakulaten der Gruppen B und C (Bullen mit 2x wöchentlicher bzw. 2x monatlicher Deckbeanspruchung), da bei diesen Tieren der Anteil geschädigter Akrosomen relativ hoch sein dürfte. Desgleichen verhindert die stabile Akrosomenhülle bei einer großen Anzahl von Spermien der Gruppe A ein rasches Austreten der Protease auf Gelatinefilmen. Die Lysisflächen der einzelnen Spermatozoen bleiben verhältnismäßig klein. Demgegenüber kann Akrosin aus den alterierten Akrosomen von Spermien der Gruppe B und C anscheinend rascher austreten und damit eine intensive Lysiswirkung auf der Substratschicht entwickeln.

Inwieweit die Dauer des Nebenhodenaufenthalts von Samenzellen und die damit verbundene Aktivierung eines Proenzym in Zusammenhang mit den Akrosinaktivitäten bei unterschiedlicher Deckbeanspruchung stehen, bleibt vorläufig Spekulation.

Interessanterweise zeigen die morphologischen

und enzymatischen Untersuchungen des akrosomalen Systems bei Spermien von Bullen mit unterschiedlicher Ejakulationsfrequenz überraschende Parallelen zu Versuchen von SCHMIDT und Mitarbeitern (1957): Sie stellten fest, daß Bullen, die im 8-Tage-Intervall deseminiert wurden, bessere Spermaqualität (Befruchtungsfähigkeit, gemessen an der Anzahl Inseminationen/Konzeption) aufwiesen als Tiere die häufiger bzw. seltener zur Spermagewinnung herangezogen wurden. HAFS und Mitarbeiter (1959) fanden allerdings keinen Zusammenhang zwischen Deckbeanspruchung der Bullen und Befruchtungserfolg mit den jeweiligen Ejakulaten.

Die Verbindungen zwischen Akrosomenmorphologie, Enzymaktivität und Befruchtungsfähigkeit von Spermien sind natürlich von vielen Faktoren abhängig. Sie scheinen aber durchaus überprüfenswert und können neue Maßstäbe auf dem Gebiet der Fertilitätsdiagnose setzen.

Von jedem untersuchten Ejakulat wurde der Prozentsatz lysisbildender Spermien auf Gelatinemembranen und der prozentuale Anteil "lebender", ungefärbter Samenzellen nach Lebend-Tot-Färbung festgehalten (Abb. 13; Tab. 7). Bei Vergleich dieser Parameter ergab sich eine positive Korrelation ($r = +0,83$; $P \leq 0,01$). Daraus ist zu entnehmen, daß nur Zellen mit ungeschädigten Membranen (bei Vitalfärbung) auf Gelatinesubstratfilmen aktiv reagieren. Eine direkte Gegenüberstellung der lebenden und lysisbildenden Spermien/Ejakulat macht dies deutlich (Tab. 7). Die entsprechenden Prozentsätze sind bei Spermatozoen von Bullen, die 5x täglich deseminiert wurden, identisch. Allerdings ist der prozentuale Anteil lysisbildender Spermien aus Ejakulaten von Bullen, die 2x wöchentlich bzw. 2x monatlich zur Spermagewinnung herangezogen wurden, jeweils wesentlich höher ($P \leq 0,01$ bzw. $P \leq 0,05$), als nach Auszählung der ungefärbten Spermien auf dem Fürbeausstrich zu erwarten war. Obwohl die angewendete Färbemethode (Bromphenolblau) eine einwandfreie Unterscheidung zwischen "lebenden" und "toten" Samenzellen nicht immer zuläßt (EIRL, 1959), ist es unwahrscheinlich, daß derartige Differenzen von prozentualer Lysisbildung zu dem Lebendanteil von Samen-

zellen zufällig auftreten. Unter Umständen haben auf Gelatinefilm einzelne Spermien reagiert, die sich mit Bromphenolblau anfärben ließen und somit als tot identifiziert wurden. Es könnte sich hier um Samenzellen handeln, die auf Grund leichter Membranschäden den Farbstoff zwar aufgenommen haben, aber dennoch am Leben waren. Da die Diskrepanz zwischen aktiven Zellen auf Gelatine und "lebenden" Spermien nur bei Bullen mit längeren Deckintervallen auftrat, erscheint es möglich, daß die beim Nebenhodenaufenthalt veränderten Akrosomen der Samenzellen zwar farbdurchlässig waren, aber trotzdem auf Substratfilmen enzymatisch reagiert haben. Dies würde auch den von WELLS und Mitarbeitern (1970a) gefundenen erhöhten Anteil "toter" Spermien nach Eosinfärbung erklären, der im Ejakulat von Bullen mit langen Deckpausen auftrat. Bei eigenen Untersuchungen wurden allerdings Zusammenhänge dieser Art nicht festgestellt.

Mehrere Ejakulate wurden unmittelbar nach der Gewinnung bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C mit und ohne glyzerinhaltigem Verdünner über 4 - 6 Tage gelagert. Damit sollte der Einfluß tiefer, unphysiologischer Temperaturen auf die Akrosinaktivität der Spermien überprüft werden. Die Abkühlung der Samenzellen auf $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. das Einfrieren bei -20°C hatte einen deutlichen Abfall der extrahierbaren Akrosinaktivität gegenüber Nativspermien zur Folge (Tab. 8, 10 und 11). Dementsprechend verringerte sich die durchschnittliche Lysisfläche auf Gelatinemembranen (Tab. 12 und 13). Im Gegensatz zu den Depolymerisationszonen frischer Spermien war bei gelagerten Samenzellen die unterschiedliche Hofbildung um den Akrosomenabschnitt auffallend. Neben kleinen, undeutlich begrenzten Reaktionskreisen wurden extrem große Proteolyseflächen beobachtet (Abb. 19 und 20). Diese Erscheinungen könnten auf folgende biochemische und physikalische Vorgänge zurückzuführen sein: Hemmversuche der Gelatineproteolyse mit niedermolekularen, synthetisch hergestellten Trypsin-Inhibitoren hatten nur dann Erfolg, wenn die Proteasehemmer in direkten Kontakt mit Akrosin kommen konnten (PENN und Mitarbeiter, 1972).

Dabei schienen Membranveränderungen an Kopfkappen das Eindringen des Inhibitors in das Akrosom zu erleichtern. Akrosin wurde nach einer gewissen Inkubationszeit der Sperma-Gelatine-Präparate irreversibel gehemmt. Natürliche, großmolekulare Trypsin-Inhibitoren aus dem Seminalplasma sind jedoch erst nach schweren Membranschädigungen, wie sie beispielsweise nach rascher Abkühlung oder Einfrieren an den Akrosomen der Spermien auftreten (SALISBURY und VANDEMARK, 1961), in der Lage, die Akrosomenhüllen zu durchdringen und mit Akrosin einen Protease-Inhibitor-Komplex zu bilden. Akrosin wird daher bereits während der Spermalagerung maskiert und kann nach Auftragen der Spermien auf die Gelatinemembran nur wenig proteolytische Aktivität entwickeln. Die Lysisflächen dieser Spermatozoen bleiben klein. Wahrscheinlich sind einige Spermien der Lagerejakulate gegen tiefere Temperaturen äußerst widerstandsfähig (EIBL, 1959). Bei solchen Zellen dürfte die Akrosomenmembran nur leicht geschädigt werden. Sie ist daher einerseits für großmolekulare Seminalplasma-Inhibitoren nicht passierbar, andererseits kann Akrosin durch die angegriffenen Spermienmembranen besonders rasch aus dem Akrosom austreten und mit der umgebenden Gelatine reagieren. Innerhalb kurzer Zeit entstehen Lysishöfe mit überdurchschnittlichem Flächeninhalt.

Über den prozentualen Anteil "großer" und "kleiner" Lysishöfe könnten demnach Rückschlüsse auf das Verhältnis von kälteempfindlichen und relativ kältestabilen Spermien pro Ejakulat gezogen werden. Die Anwendung der Gelatinesubstratfilm-Methode als Test für die Tiefgefriertauglichkeit von Bullenejakulaten ist denkbar.

Die unterschiedlichen, proteolytischen Aktivitäten auf Gelatinemembranen nach Lagerung der Spermien bei tiefen Temperaturen sind mit den biochemischen Meßmethoden der Akrosinaktivität (BAEE/ADH-Testsystem; BERGMAYER, 1970) nicht zu erfassen. Zur photometrischen Akrosinbestimmung werden nämlich sämtliche Spermien der Samenportion mit Essigsäure behandelt. Im Gegensatz zur Gelatinemethode, bei der die Kopfkappenhüllen teilweise erhalten bleiben, führt

die Ansäuerung zur völligen Zerstörung der Akrosomenmembranen (FINK und Mitarbeiter, 1972a). Akrosin liegt dann frei im Akrosomenextrakt vor und kann mit dem spermiengebundenen Proteaseinhibitor reagieren. Im sauren Extrakt dissoziiert der Akrosin-Inhibitor-Komplex (FINK und Mitarbeiter, 1972a; FRITZ und Mitarbeiter, 1972a) und die hydrolytische Substratspaltung wird im kombinierten BAEE/ADH-Testsystem indirekt gemessen. Die Spaltungsaktivität entspricht der extrahierten Enzymmenge. Auch bei dieser Meßmethode zeigte sich eine Aktivitätsabnahme des Akrosins nach Abkühlung (auf $+4^{\circ}\text{C}$) bzw. Einfrieren (auf -20°C) der Samenzellen. Da Akrosin kältestabil ist (GARNER und Mitarbeiter, 1972), muß die Abnahme der Enzymaktivität auf Membraneffekte der Akrosomen zurückgeführt werden. Um das Seminalplasma der Ejakulatprobe auszuwaschen, wurden die Spermien vor der Enzymextraktion mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung zentrifugiert und resuspendiert. Dieser Waschvorgang resultiert, wird er mehr als 6 mal wiederholt, bereits bei Samenzellen mit scheinbar intakten Membranen in einer Erniedrigung der extrahierbaren Akrosinaktivität (SCHILL, 1973a). Werden nun membrangeschädigte Spermien (nach Einwirkung tieferer Temperaturen) auf diese Weise vorbehandelt, so kommt es wahrscheinlich zu einem Enzymverlust in der spermiengereinen, abzentrifugierten Überstand (Seminalplasma). Im Akrosomenextrakt sedimentierter Spermatozoen ist daher relativ wenig Akrosin nachzuweisen (CHURCH und GRAVES, 1973).

Sowohl auf Gelatinemembranen als auch bei der photometrischen Meßmethode hängt dennoch die bestimmbare Akrosinaktivität in hohem Maße vom Membranzustand der Spermienakrosomen ab. Andere Autoren bestätigen diese Vermutung (IEDERSEN, 1972; CHURCH und GRAVES, 1973; SCHILL, 1973b). Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Membranschädigung und dem Enzymverlust: Verdünntes Sperma, das auf $+4^{\circ}\text{C}$ abgekühlt wurde, wies nach mehrstündiger Lagerung höhere Akrosinaktivität auf als Samenzellen, die bei -20°C mit Verdünner eingefroren wurden. Da die Ejakulate relativ rasch unter die kritische Temperatur ($+15,5^{\circ}\text{C}$) abgekühlt wurden, haben sich

wahrscheinlich im Verlauf des Kälteschocks Veränderungen der inneren und äußeren Spermienstruktur ergeben, die beim langsamen Einfrieren auf -20°C (im Kühlschrank) noch verstärkt wurden. Als besonders schädlich erweisen sich hierbei die Verschiebungen der Elektrolytkonzentrationen bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt des Spermas ($-0,53^{\circ}\text{C}$). Der dabei auftretende osmotische Schock schädigt die Samenzellen derart, daß Spermien bereits nach 24-stündiger Lagerung bei -23°C nach dem Auftauen keine Motilität mehr zeigen (SALISBURY und VANDEMARK, 1961). Dementsprechend verloren eingefrorene Spermien die gesamte Enzymaktivität, während sie bei abgekühlten Zellen weitgehendst erhalten blieb (Tab.10-13). Der Zusatz von glyzerinhaltigem Verdünner scheint sich daher nur bei eingefrorenen Ejakulaten günstig auszuwirken. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß die beim Einfrieren auftretenden osmotischen Druckveränderungen durch Zusatz von Glycerin teilweise abgefangen werden. Erfolgt jedoch nur eine Abkühlung auf $+4^{\circ}\text{C}$, so ist die glyzerinhaltige Sperma verdünnung nicht notwendig. Die Akrosinaktivität dieser Proben ($+4^{\circ}\text{C}$; unverdünnt) unterschied sich nicht vom Nativsperma. Nach Verdünnung kam es sogar zu einer Abnahme der Aktivität (Tab.11).

Völlig gegensätzlich waren die Ergebnisse auf Gelatinefilmen: bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagerte Samenzellen ohne Verdünner, zeigten durchschnittlich kleinere Lysiskreise als die entsprechenden Nativspermien. Verdünnt gelagerte Spermatozoen entwickelten jedoch gleich große Depolymerisationszonen wie frische Zellen des selben Ejakulats (Tab.13).

Überraschenderweise wirkte sich die unterschiedliche Deckbeanspruchung der Bullen nicht nur auf die Akrosinaktivität frischer Spermien, sondern auch auf den akrosomalen Enzymkomplex von Samenzellen aus, die bei unphysiologischen Temperaturen gelagert wurden. Aus sieben eingefrorenen Spermaproben von Bullen, die 5x täglich deseminiert wurden, konnte nach dem Auftauen nur noch aus einer Spermaportion Akrosinaktivität ermittelt werden (Tab.8). Unter gleichen Bedingungen eingefrorene Ejakulate von Bullen, die 2x wöchentlich bzw. 2 mal

Im Monat zur Spermagewinnung herangezogen wurden, zeigten zwar niedrige, aber meßbare Proteaseaktivitäten der Spermien. Inwieweit der bereits niedrige Ausgangswert des Nativspermas oder die relativ hohen Anteile morphologisch intakter Samenzellen bei Bullen mit kurzen Deckintervallen damit zusammenhängen, bleibt fraglich. Als Folgerung für die Praxis ergibt sich aber, daß unterschiedliche Deckbeanspruchung, die damit verbundenen Akrosomenalterationen sowie die unterschiedliche Eignung von Samenzellen für die Spermialagerung enzymatisch erfaßbar sind und eventuell mit dem Befruchtungsvermögen der Spermien in Zusammenhang gebracht werden können.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit machen deutlich, daß Veränderungen am akrosomalen System von Bullenspermien, sei es durch äußere oder innere Faktoren, nicht immer einwandfrei mit den üblichen Methoden der morphologischen Spermabeurteilung erkannt werden. Die Akrosinbestimmung erlaubt es erstmals, den für das Befruchtungsvermögen der Spermien ausschlaggebenden Akrosomenabschnitt enzymatisch gesondert zu untersuchen. Darüberhinaus kann das einzelne Spermium mit Hilfe des Gelatinesubstratfilmverfahrens in die Untersuchung einbezogen werden. Es ist somit ein hervorragendes Testsystem für die enzymatische Analyse der Spermienpopulation. Beide Methoden der quantitativen Akrosinbestimmung zeichnen sich durch einen großen Anwendungsbereich aus, der in klinisch-diagnostischer und physiologisch-funktioneller Hinsicht erweitert werden kann. Vor allem bei Befruchtungstörungen von Spermien könnte eine akrosomale Enzymbestimmung die bisherigen Untersuchungskriterien sinnvoll ergänzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der enzymatischen Bestimmung von Akrosin, einer akrosomalen Protease, wurden die Auswirkungen akrosomen-schädigender Vorgänge in vivo und in vitro auf die Akrosinaktivität der Spermienpopulation bzw. einzelner Samenzellen überprüft.

Die Akrosinaktivität der Spermien aus 82 Ejakulaten von 8 Fleckviehbulen wurde sowohl biochemisch als auch histochemisch ermittelt. Für das biochemische Verfahren wurde Akrosin mit 2%iger Essigsäure aus den Akrosomen extrahiert und über das kombinierte BAEE ADH-Testsystem quantitativ erfaßt. Parallel hierzu wurde als histochemische Nachweismethode die proteinspaltende Akrosinaktivität auf Gelatine-substratfilmen benutzt. Über die entstandenen Depolymerisationsflächen um den Spermienkopf konnte die proteolytische Wirkung von Akrosin quantitativ bestimmt werden.

Um die Spezifität der Spermienprotease auf Gelatine abzusichern, wurde die Lysisreaktion der Samenzellen nach

- Akrosinextraktion mit Essigsäure vor Auftragen der Zellen auf die Gelatinemembran,
- Inkubation der Substratschicht mit einem Akrosin-Inhibitor aus Seminalplasma vom Eber (1,0 mg/ml)
- und durch den Vergleich mit den biochemischen Meßergebnissen überprüft.

Zusätzlich wurde der Einfluß unterschiedlicher Deckbeanspruchung von Bullen (5x täglich, 2x wöchentlich bzw. 2x monatlich) sowie unphysiologischer Temperaturen in vitro (Aufbewahrung der Spermaportionen bei +4°C bzw. -20°C mit und ohne glyzerinhaltigem Verdünnern über 4 - 6 Tage) auf die Akrosinaktivität der Spermienpopulation und einzelner Samenzellen untersucht.

Die Spezifität der proteolytischen Wirkung von Akrosin auf Gelatine ist gegeben durch:

- das Ausbleiben der Gelatineproteolyse nach Akrosinextraktion vor Auftragen der Spermien auf die Substratfilme,
- die ausbleibende Lysisreaktion auf Gelatinemembranen, die mit einem gereinigten Protease-Inhibitor aus dem Seminalplasma von Ebersperma inkubiert wurden
- und die positive Korrelation der durchschnittlichen Lysisfläche einzelner Spermien zur biochemisch ermittelten Akrosinaktivität der entsprechenden Spermienpopulation ($r = +0,83$; $P \leq 0,01$).

Häufige Desemination der Bullen (5x täglich) führt zu einer Abnahme der Akrosinaktivität gegenüber Samenzellen aus Ejakulaten, die 2x wöchentlich bzw. 2x monatlich gewonnen werden ($P \leq 0,01$). Nach Lagerung von Ejakulaten bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C mit glyzerinhaltigem Verdünner über 4 bis 6 Tage verlieren die Spermien hohe Anteile der Akrosinaktivität ($P \leq 0,05$ bzw. $P \leq 0,01$). Die Enzymaktivität der Spermienpopulation bleibt nach Lagerung der Ejakulate bei $+4^{\circ}\text{C}$ ohne Verdünner annähernd erhalten. Auf Gelatinemembranen ist die proteolytische Aktivität dieser Samenzellen jedoch deutlich eingeschränkt ($P \leq 0,05$). Werden die Ejakulate bei -20°C unverdünnt aufbewahrt, so ist nach dem Auftauen sowohl bei der Spermienpopulation als auch beim einzelnen Spermium keine Enzymaktivität mehr nachzuweisen.

Die biochemische und histochemische Akrosinbestimmung liefert vergleichbare Ergebnisse. Extrahierbare Akrosinaktivität und Gelatineproteolyse bei Bullenspermien sind in hohem Maße vom Membranzustand der Akrosomen abhängig. Daher eignen sich beide Verfahren zum Nachweis morphologisch nicht erkennbarer Membranschäden am akrosomalen Spermienabschnitt. Darüberhinaus vereinigt die Gelatinesubstratfilm-Methode die morphologische und enzymatische Untersuchung des Akrosomenkomplexes in ein und demselben Testsystem.

SUMMARY

Factors detrimental to sperm acrosomes in vivo and in vitro were investigated with regard to their influence on the acrosomal proteolytic enzyme of sperm population and on individual spermatozoa by determination of acrosin activity.

Acrosin activity was determined from ejaculated spermatozoa by both biochemical and histochemical methods employing 82 ejaculates from 8 bulls. The acrosomal protease was extracted with acetic acid and evaluated using the combined BAEE/ADH test system as a biochemical enzyme determination. Parallel to this, a histochemical procedure was used to detect the proteolytic enzyme activity on gelatin membranes. Depolymerized areas of the substrate films were used to evaluate the proteolytic effect of acrosin.

In order to point out the specificity of the acrosomal protease on gelatin substrate, lysis reaction of an individual spermatozoon was observed after

- extraction of acrosin with acetic acid before application of cells on the gelatin membrane,
- incubation of the substrate layer with an acrosin inhibitor from boar seminal plasma (1.0-0.1 mg/ml)
- and finally, lysis areas were compared with biochemical data.

Additionally, the effect of different ejaculation frequencies and nonphysiological temperatures on acrosin activity of sperm population and individual spermatozoa were investigated.

Acrosin activity on gelatin substrate was emphasized by

- an absence of any proteolytic reaction after enzyme extraction before application of sperm on gelatin
- an absence of halo formation after incubation of the substrate layer with purified protease inhibitor from boar seminal plasma
- a positive correlation ($r = + 0.83$; $P \leq 0.01$) between

the mean lysis areas of individual spermatozoa and acrosin activity from sperm population. Collection of semen 5 times a day is effective in reducing the acrosin activity as compared to spermatozoa from ejaculates which were collected twice a week or twice a month ($P \leq 0.01$). Sperm storage at $+4^{\circ}\text{C}$ and -20°C with glycerolic medium over 4 to 6 days result in a significant loss of acrosin activity ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$ respectively). Spermatozoa which are stored at $+4^{\circ}\text{C}$ without any admixture retain most of their enzymatic activity. On gelatin membranes however, lysis areas are clearly reduced ($P \leq 0.05$). No activity is observed after storage of undiluted sperm at -20°C whether histochemical or biochemical procedures are used for enzyme determinations.

Both biochemical and histochemical acrosin determinations yield comparable results and depend highly on the status of the acrosomal membranes. Therefore, both procedures would qualify for examination of acrosomal membrane alterations which are difficult to detect morphologically. More than that, the gelatin substrate method could be practicable for both enzymatic and morphologic acrosomal examination in the same test system.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAM, J.; SCHAF, J.-H. und H. ENKE (1971)
Methoden der statistischen Analyse in
Medizin und Biologie
Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- ADAMS, C.W.M. und N.A. TUQAN (1961)
The histochemical demonstration of protease
by a gelatin-silver film substrate
J. Histochem. Cytochem. 2: 469
- ALLEN, G.J.; BISHOP, M.W.H. und T.E. THOMPSON (1973)
Lysis of photographic emulsions by mammalian
and chicken spermatozoa
J. Reprod. Fert. 36: 249
- ALLISON, A. (1967)
Lysosomes and disease
Scientific American 217: 62
- ALLISON, A. und E.F. HARTREE (1969)
Lysosomal enzymes in the acrosome and
their possible role in fertilization
J. Reprod. Fert. 21: 501
- AUSTIN, C.R. (1969)
Sperm capacitation - Biological significance
in various species
In: Advances in the Biosciences 4: 1
Schering Symposium 1969
Pergamon Press

- BEDFORD, J.M. (1969)
Morphological aspects of sperm capacitation
in mammals
In: Advances in the Biosciences 4: 35
Schering Symposium 1969, Pergamon Press
- BEDFORD, J.M. (1970 a)
Sperm capacitation and fertilization in
mammals
Biol. Reprod. 2: 143
- BEDFORD, J.M. (1970 b)
Sperm capacitation and fertilization in
mammals
Biol. Reprod. 2: 128
- BENITEZ-BRIBIESCA, L. und S. VELAZQUEZ-MEZA (1972)
Cytochemical demonstration of proteolytic
activity of human and rat spermatozoa
J. Reprod. Fert. 22: 419
- BERGSTROM, S. (1970)
Estimation of proteolytic activity at mouse
implantation sites by the gelatin digestion
method
J. Reprod. Fert. 23: 481
- BERGMEYER, H.U. (1970)
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- BERNSTEIN, M.H. und R.J. TEICHMAN (1973)
A chemical procedure for extraction of the
acrosomes of mammalian spermatozoa
J. Reprod. Fert. 33: 239

BHALLA, V.K.; DOHANIAN, A.O.; NEWELL, S.O. und W.L. WILLIAMS
(1972)

Properties and improved assay of
decapacitation factor
Fedn. Proc. 31: 364 (Abs. 278)

CHANG, M.C. (1957)

A detrimental effect of seminal
plasma on the fertilizing capacity
of sperm
Nature, London, 179: 258

CHANG, M.C. und R. YANAGIMACHI (1963)

Fertilization of ferret ova by de-
position of epididymal sperm into the
ovarian capsule with special reference
to the fertilizable life of ova and
capacitation of sperm
J. Exp. Zool. 154: 175

CHURCH, K.E. und C.N. GRAVES (1973)

Acrosomal proteinase loss after cold
shock of bovine sperm
J. Anim. Science 37: 304

CONRAD, K.; BUCKLEY, J. und R. STAMBAUGH (1971)

Studies on the nature of the block
to polyspermy in rabbit ova
J. Reprod. Fert. 27: 133

CUNNINGHAM, L. (1967)

Histochemical observations of the enzymatic
hydrolysis of gelatin films
J. Histochem. Cytochem. 15: 292

DAOUST, R. (1965)

Histochemical localization of enzymes activities by substrate film methods: nucleases, desoxyribonucleases, proteases, amylase and hyaluronidase
Int. Rev. Cytol. 18: 191

DAOUST, R. (1966)

Modified procedure for the histochemical localization of ribonuclease activity by the substrate film method
J. Histochem. Cytochem. 14: 254

DICKMANN, Z. (1965)

Sperm penetration into and through the zona pellucida of the mammalian egg
In: Preimplantation stages of pregnancy
Eds. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor.
Churchill, London

DOTT, H.M. und J.P. DINGLE (1968)

Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram
Exp. Cell.Res. 52: 523

EDWARDS, R.G. (1972)

Current concepts on fertilization in mammals
Research in reproduction 4: 214

EIBL, K. (1959)

Lehrbuch der Rinderbesamung
Paul Parey in Berlin und Hamburg

EL-SAWAF, S.A. und A.B. EL-WISHY (1970)

Effect of frequency of ejaculation on libido,
semen production and seminal characters in
mature nativebulls
Animal Breeding Abstracts 41: 11 Abs. 108)

ERICSSON, R.J. (1969)

Methods for measurement of sperm capacitation
in different species
In: Advances in the Biosciences 4: 51
Schering Symposium 1969, Pergamon Press

ERICSSON, R.J. und D.A. BUTHALA (1970)

A fluorescence staining method for studying sperm
membranes
Biol. Reprod. 3: 8

FAWCETT, D.W. (1970)

A comparative view of sperm ultrastructure
Biol. Reprod. 2: 90

FINK, E.; SCHIEFER, H.; ARNHOLD, M. und H. FRITZ (1972 a)

Isolation of a trypsin-like enzyme (acrosin)
from boar spermatozoa
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1633

FINK, E.; FRITZ, H.; JAUMANN, E.; SCHIESLER, H.; FÖRG-BREY, B.
und E. WERLE (1972 b)

Protein proteinase inhibitors in male sex glands
and their secretions

In: Protides of the biological fluids.

Proceedings of the twentieth Colloquium,
Brugge, 1972

Pergamon Press. Ed. H. Peters

FRANKLIN, L.E.; BARROS, C. und E.N. FUSELL (1970)

The acrosomal region and the acrosomal reaction
in sperm of the golden hamster

Biol. Reprod. 3: 180

FRASER, L.R.; DANDEKAR, P.V. und R.A. VAIDYA (1971)

In vitro fertilization of tubal rabbit ova
partially or totally denuded of follicular
cells

Biol. Reprod. 4: 229

FRATELLO, B. (1968)

Enhanced interpretation of tissue protease
activity by use of photographic color film
as a substrate

Stain Technol. 37: 377

FRITZ, H.; FINK, E. und R. MARX (1971)

Ansatzpunkte für eine antienzymatische
Kontrazeption

In: Sexualhormone und Blutgerinnung

XIV. Hamburger Symposium über Blutgerinnung

Eds.: Marx, R. und H.A. Thies

Verlag Schattauer, F.K., Stuttgart, N.Y.

FRITZ, H.; FÜRG-BREY, B.; FINK, E.; MEIER, M.; SCHIESLER, M.
und M. SCHIRREN (1972 a)

Humanakrosin: Gewinnung und Eigenschaften
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1943

FRITZ, H.; SCHIESLER, H. und W.-D. SCHLEUNIG (1972 b)

Proteinases and proteinase inhibitor in
the fertilization process: new concepts
of control

In: Advances in the Bioscience 10
Pergamon Press. Ed. Gerhard Raspe

FRITZ, H.; FÜRG-BREY, B.; SCHIESLER, H.; ARNHOLD, M. und
E. FINK (1972 c)

Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen
Protease (Akrosin) aus Eberspermien durch
ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-
Proteinase-Inhibitoren,

II. Inhibitoren aus Blutegeln, Sojabohnen,
Erdnüssen, Rinderkolostrum und Seeanemonen
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1010

FRITZ, H.; SCHIESLER, H.; FÜRG-BREY, B.; TSCHESCHE, H. und
E. FINK (1972 d)

Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen
Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch
ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-
Proteinase-Inhibitoren,

III. Inhibitoren aus Bauchspeicheldrüsen
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1013

FRITZ, H.; FÜRG-BREY, B.; MEIER, M.; ARNHOLD, M. und H.
TSCHESCHE (1972 e)

Humanakrosin: Hemmbarkeit durch Protein-
Proteinase-Inhibitoren

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1950

FRITZ, H.; FÖRG-BREY, B.; FINK, E.; SCHWOLTER, H.; JAUMANN, E.
und M. ARNHOLD (1972 f)

Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen
Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch
ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-
Proteinase Inhibitoren,

I. Seminale Trypsininhibitoren und Trypsin-
Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352: 1007

FRITZ, H.; HEIMBURGER, N.; MEIER, M.; ARNHOLD, M.; ZANEVELD,
L.J.D. und SCHUMACHER, G.F.B. (1972 g)

Humanakrosin: Zur Kinetik der Hemmung durch
Human-Seruminhibitoren

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1953

GADDUM, P. und R.J. BLANDAU (1970)

Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa
on gelatin membranes

Science, N.Y. 170: 749

GADDUM-ROSCE, P. und R.J. BLANDAU (1972)

Comparative studies on the proteolysis of
fixed gelatin membranes by mammalian sperm
acrosomes

Am. J. Anat. 164: 133

GARNER, D.L.; GRAVES, C.N. und O.P. SHARMA (1971)

Electrophoretic characterization of the
trypsin-like activity from ejaculated and
uterin incubated rabbit spermatozoa

Biol. Reprod. 5: 84

GARNER, D.L.; SALISBURY, G.W. und C.N. GRAVES (1972)

Changes in the acrosomal proteins and pro-
teinase following storage of bovine spermatozoa
at +4°C

J. Dairy Sci. 55: 696 (Abs.)

- GWATKIN, R.B.L.; ANDERSON, C.F. und C.F. HUTCHINSON (1972)
Capacitation of hamster spermatozoa in vitro:
The role of cumulus components
J. Reprod. Fert. 30: 389
- GWATKIN, R.B.L.; WILLIAMS, D.T.; HARTMANN, J.F. und M. KNIAZUK
(1973)
The zona reaction of hamster and mouse eggs:
Production in vitro by a trypsin-like protease
from cortical granules
J. Reprod. Fert. 32: 259
- HAENDLE, H.; FRITZ, H.; TRAUTSCHOLD, I. und E. WERLE (1965)
Über einen hormonabhängigen Inhibitor für
proteolytische Enzyme in männlichen
accessorischen Geschlechtsdrüsen und im
Sperma
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 343: 185
- HAENDLE, H.; INGRISCH, H. und E. WERLE (1970)
Zur Bedeutung des Proteasen-Inhibitors des
Stügerspermas bei der Befruchtung und zur
Frage der Identität mit dem Dekapazitations-
faktor
Klin. Wschr. 48: 524
- HAEG, H.D.; HOYT, R.S. und R.W. BRATTON (1950)
Libido, sperm characteristics, sperm output
and fertility of mature dairy bulls ejaculated
daily or weekly for 32 weeks
J. Dairy Sci. 42: 636

- HARTMANN, J.F. und R.B.L. GWATKIN (1971)
Alteration of sites on the mammalian
sperm surface following capacitation
Nature, London, 234: 479
- HATHEWAY, R.R. und E.F. HARTREE (1963)
Observation on the mammalian acrosome:
experimental removal of the acrosomes
from ram and bull spermatozoa
J. Reprod. Fert. 5: 225
- HIRSCHHAUSER, C. und S. BAUDNER (1972)
Immunologic localization of the human seminal
plasma protease inhibitor in human spermatozoa
Fert. Steril. 23: 393
- HO, J.J.L. und S. MEIZEL (1970)
Electrophoretic detection of multiple forms
of trypsin-like activity in spermatozoa of
the domestic fowl
J. Reprod. Fert. 23: 177
- JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R. und N.L. VANDEMARK (1970)
Epididymal sperm reserves
In: The testis I
Development, Anatomy and Physiology
Academic Press, New York and London
- JOHNSON, M.P.; HARRISON, R.M. und W.R. DUKELOW (1972)
Studies on the oviductal fluid and in vitro
fertilization in rabbits and nonhuman pri-
mates
Fedn. Proc. 311: 369 (Abs. 278)

- JONES, R.C. (1973 a)
The plasma membrane of ram, boar and bull
spermatozoa
J. Reprod. Fert. 33: 179
- JONES, R.C. (1973 b)
Changes occurring in the head of boar spermatozoa: vesiculation or vacuolation of the acrosome ?
J. Reprod. Fert. 33: 113
- KOEFCED-JOHNSON, H.H. (1960)
Influence of ejaculation frequency on the time required for sperm formation and epididymal passage in the bull
Nature 185: 49
- KOEHLER, J.K. (1972)
Human sperm head ultrastructure:
A freeze-etching study
J. Ultrastruct. Res. 39: 520
- LEWIS, B.K. und M.M. KETCHEL (1971)
Release of hyaluronidase by rabbit sperm incubated in-vitro
Fedn. Proc. 50: 595 (Abs. 2240)
- MANN, TH. (1964)
Biochemistry of semen and of the male reproductive tract
Ed. Methuen, London (1964)

- MEIZEL, S. (1972)
Biochemical detection and activation of
an inactive form of a trypsin-like enzyme
J. Reprod. Fert. 31: 459
- MIYAMOTO, H. und M.C. CHANG (1972)
Fertilization in vitro of mouse and hamster
eggs after the removal of follicular cells
J. Reprod. Fert. 30: 309
- MOOR, R.M. und R.G. CRAGLE (1971)
The sheep egg. Enzymatic removal of the
zona pellucida and culture of eggs in vitro
J. Reprod. Fert. 27: 401
- MUDRA, A. (1958)
Statistische Methoden für landwirt-
schaftliche Versuche
Paul Parey, Berlin und Hamburg
- MULTAMÄKI, S. und M. NIEMI (1969)
Zona pellucida dissolving protease in an
acrosomal preparation of the bull spermatozoa
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 23: 80
- MULTAMÄKI, S. und N. MIKKO (1972)
Trypsin-like proteolytic activity in an
acrosomal extract of bull spermatozoa
Int. J. Fert. 17: 43

NEWELL, S.O. und W.L. WILLIAMS (1972)

Inhibition of fertilization by synthetic
proteinase inhibitors

Fedn. Proc. 31: 367(Abs. 278)

NICANDER, L. und A. BANE (1966)

Fine structure of the sperm head in some
mammals with particular reference to the
acrosome and subacrosomal substance

Z. Zellforsch. 72: 496

OWERS, N.O. (1970)

A new method of determination of the proteo-
lytic activity of certain bacteria, fungi
and mammalian cells in vitro using fixed
gelatin membrane substrate

J. Cell Biol. 47: 152a

PAVLOK, A. und M. McLAREN (1972)

The role of the cumulus cells and the zona
pellucida in fertilization of mouse eggs in
vitro

J. Reprod. Fert. 29: 21

PEDERSEN, H. (1972)

The acrosome of the human spermatozoon
- a new method for its extraction, and an
analysis of its trypsin-like enzyme

J. Reprod. Fert. 31: 99

- PENN, A.; GLEDHILL, B.L. und Z. DARZYNKIEWICZ (1972)
Modification of the gelatin substrate
procedure for demonstration of acro-
somal proteolytic activity
J. Histochem. Cytochem. 20: 499
- POLAKOSKI, K.L.; ZANEVELD, L.J.D. und W.L. WILLIAMS (1972a)
Purification of a proteolytic enzyme
from rabbit acrosomes
Biol. Reprod. 6: 23
- POLAKOSKI, K.L.; WILLIAMS, W.L. und R.A. McRORIE (1972b)
Purification and properties of acrosin,
an arginyl proteinase from sperm acro-
somes
Fedn. Proc. 31: 278 Abs.
- PRAKASH, N. und P.N. SRIVASTAVA (1973)
Removal of acrosomes of ram and
rabbit spermatozoa
J. Reprod. Fert. 33: 323
- ROMPP, H. (1966)
Chemie Lexikon II
Franckh'sche Verlagshandlung
Stuttgart, 1966

- SAACKE, R.G. und J.O. ALMQUIST (1964)
Ultrastructure of bovine spermatozoa.
1. The head of normal, ejaculated sperm.
Amer. J. Anat. 112: 1-5
- SAACKE, R.G. und C.E. MARSHALL (1968)
Observations on the acrosomal cap of
fixed and unfixed bovine spermatozoa
J. Reprod. Fert. 16: 511
- SALISBURY, G.W. und N.L. VANDEMARK (1961)
Principles and techniques of spermatozoan
preservation
In: Physiology of reproduction and artificial
insemination of cattle
Ed. W.H. Freeman and Company
San Francisco and London
- SCHIEBLER, M.; FRITZ, H.; ARNHOLD, M.; FINK, E. und
H. TSCHESCHE (1973)
Eigenschaften des Trypsin-ähnlichen Enzyms
(Akrovin) aus Eberpermien
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1658
- SCHILL, W.-B. (1973 a)
Methodische Untersuchungen zur Akrovin-
aktivität in menschlichen Spermatozoen
- Korrelation zwischen Akrovin und Sper-
matozoendichte
Vortrag zur Jahrestagung 1973, Dtsch. Ges.
zum Stud. der Fert. und Steril. 15. - 16.
April 1973 (Freiburg/Br.)
- SCHILL, W.-B. (In Vorbereitung)

SCHILL, H.-B. (1975 b)

Der Einfluß kryobiologischer Behandlung von
Humanosperma auf die Aktivität der akrosomalen
Protease Akrocin

andrologie 1 (1975) Preliminary Communication

SCHIRREN, C. und A. EWELS (1975)

Akrocinaktivität in menschlichen Spermatozoen
und Spermatozoendichte im Ejakulat

andrologie 2: 81

SCHMIDT, K.; STRASSBURG, H. und G. KOPFATH (1957)

Effect of sexual rest on various sperm
characters and fertility in breeding bulls
Tierzucht, 10: 7

SCHUMACHER, G.F.B.; SWARTWOUT, J.R. und F.P. ZUSPAN (1971)

Fertility experiments in mice and rabbits
with the lysal-killers II-inhibitor from
bovine liver

In: Proc. Int. Res. Conf. on Protease Inhibi-
tors, Munich, Germany, 1970, S. 267

Eds. H. Fritz and H. Tschesche.

W. de Gruyter, Berlin and New York.

SCHUMACHER, G.F.B. und L.J.D. ZANEVELD (1971)

Interaction of acrosomal protease from human
and rabbit spermatozoa with human protease
inhibitor

Fedn. Proc. 51: 45 (Abstr. 1971)

STAMBAUGH, R. und J. BUCKLEY (1968)

Zona pellucida dissolution.
Enzymes of the rabbit sperm
head
Science 161: 585

STAMBAUGH, R. und J. BUCKLEY (1969)

Identification and subcellular
localization of the enzymes effecting
penetration of the zona pellucida by
rabbit spermatozoa
J. Reprod. Fert. 19: 423

STAMBAUGH, R. und J. BUCKLEY (1972)

Histochemical subcellular localization
of the acrosomal proteinase effecting
dissolution of the zona pellucida using
fluorescein-labeled inhibitors
Fert. Steril. 23: 348

STEINBACH, J. und R.H. FOOTE (1964)

Post-thaw survival of bovine sper-
matozoa frozen by different methods
in buffered-yolk and skimmilk ex-
tenders
J. Dairy Sci. 47: 909

- SUOMINEN, J.; KAUFMAN, M.H. und B.P. SETCHELL (1973)
Prevention of fertilization in vitro by
an acrosin inhibitor from rete testis
fluid of the ram
J. Reprod. Fert. 34: 385
- TEICHMAN, R.J. und M.H. BERNSTEIN (1969)
A morphological and biochemical comparison
of rabbit, human and bull acrosomes
J. Cell Biol. 43: 144a (Abs.)
- TEICHMAN, R.J. und M.H. BERNSTEIN (1971)
Fine structure localization of acid
phosphatase in rabbit and bull sperm heads
J. Reprod. Fert. 27: 243
- UHLENBRUCK, G.; SPRENGER, I.; SCHUMACHER, G.F.B. und
L.J.D. ZANEVELD (1972)
Additional properties of acrosin, a proteo-
lytic enzyme from rabbit sperm acrosomes
Naturwissenschaften 59: 124
- VACQUIER, U.D.; TEGNER, J.M. und D. EPEL (1972)
Protease activity establishes the block
against polyspermy in sea urchin eggs
Nature, 240: 352
- VAIDYA, R.A.; BEDFORD, J.M.; GLASS, R.H. und J. MORRIS
(1969)
Evaluation of the removal of tetracyclin
fluorescence from spermatozoa as a test
for capacitation in the rabbit
J. Reprod. Fert. 19: 483

VERES, I.; MÜLLER, E.; ÜCSENYI, A. und J. SZILAGYI (1972)
Elektronenmikroskopische Untersuchungen
zum Vergleich von gut und mangelhaft einfrierbaren Bullenejakulaten
Zuchthyg. 2: 61

WALDSCHMIDT, M.; HOFFMANN, B. und H. KARG (1966)
Untersuchungen über die tryptische Enzymaktivität in den Geschlechtssekreten von Bullen
Zuchthyg. 1: 15

WALSH, K.A. und P.E. WILCOX (1970)
Serin proteases
In: Methods of enzymology, Vol. XIX
Eds. Perlmann, G.E. und L. Lorand
Academic Press, N.Y.

WATSON, P.F. und I.C.A. MARTIN (1971)
A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa
J. Reprcd. Fert. 28: 99

WEBER, E. (1972)
Grundriß der biologischen Statistik
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1972

WELLS, M.E.; AWA, O.A.; JAY, L.G. und S.S. FANCY (1970a)
Effect of sexual rest and frequency of ejaculation on sperm acrosomal morphology
J. Dairy Sci. 54: 526

WELLS, M.E.; WONDRAFRASH, C.T.; AWA, O.A. und D.F. STEPHENS
(1970 b)

Effect of sexual rest and subsequent regular
collection on acrosome characteristics of
bull spermatozoa
J. Anim. Sci. 31: 67

WELLS, M.E.; AWA, O.A. und S.S. FANCY (1972)
Effect of season on acrosome status
in the bull
J. Dairy Sci. 55: 1174

WELLS, M.E.; JAY, L.G. und D. HOLBERT (1973)
Contributions of acrosome state
to fertility prediction
J. Dairy Sci. 56: 639

WILLIAMS, W.L.; ROBERTSON, R.T. und W.R. DUKELOW (1969)
Decapacitation factor and capacitation
In: Advances in the Biosciences 4: 61
Pergamon Press

YAMANE, Y. (1955 a)
Kausal-analytische Studien über die Befruchtung
des Kanincheneies
1. Die Dispersion der Follikelzellen und die
Ablösung der Zellen der Corona radiata des
Eies durch Spermatozoen
Cytologia 6: 233

YAMANE, Y. (1935 b)

Kausal-analytische Studien über die Befruchtung
des Kanincheneies.

2. Die Isolierung der auf das Eizytoplasma auf-
lösend wirkenden Substanzen aus den Spermatozoen
Cytologia 6: 474

YANAGIMACHI, R. (1972 b)

The fertilization of guinea pig eggs in vitro
The Anatomical Record 174: 9

YANAGIMACHI, R. und Y.P. NODA (1972 a)

Acrosome loss in fertilizing mammalian
spermatozoa: A rebuttal of criticism
J. Ultrastruct.Res. 39: 217

YANAGIMACHI, R. und R.J. TEICHMAN (1972)

Cytochemical demonstration of acrosomal proteinase
in mammalian and avian spermatozoa by a silver
proteinate method
Biol. Reprod. 6: 87

ZANEVELD, L.J.D.; SRIVASTAVA, P.N. und W.L. WILLIAMS

(1969)

Relationship of trypsin-like enzyme in rabbit
spermatozoa to capacitation
J. Reprod. Fert. 20: 337

ZANEVELD, L.J.D.; SRIVASTAVA, P.N. und W.L. WILLIAMS (1970 a)

Inhibition by seminal plasma of acrosomal
enzymes in intact sperm
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133: 1172

ZANEVELD, L.J.D. und W.L. WILLIAMS (1970 b)

A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapacitation factor

Biol. Reprod. 2: 363

ZANEVELD, L.J.D.; POLAKOSKI, K.L.; FOLEY, C.W. und W.L. WILLIAMS (1971 a)

The role of acrosin, an acrosomal protease and acrosin inhibitors in capacitation of sperm

Fedn. Proc. 30: 2241(Abs, 595)

ZANEVELD, L.J.D.; ROBERTSON, R.T.; KESSLER, M. und W.L. WILLIAMS (1971 b)

Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors

J. Reprod. Fert. 25: 387

ZANEVELD, L.J.D.; POLAKOSKI, K.L. und W.L. WILLIAMS (1972 a)

Properties of acrosin, a proteolytic enzyme from rabbit sperm acrosomes

Biol. Reprod. 6: 30

ZANEVELD, L.J.D.; DRAGOJE, B.M. und G.F.B. SCHUMACHER

(1972 b)

Acrosomal proteinase and proteinase inhibitor of human spermatozoa

Science, 177: 702

ZANEVELD, L.J.D.; POLAKOSKI, K.L. und G.F.B. SCHUMACHER

(1973 a)

Properties of acrosomal hyaluronidase from bull spermatozoa: Evidence for its similarity to testicular hyaluronidase

J. Biol. Chem. 248: 564

ZANEVELD, L.J.D.; SCHUMACHER, G.F.B. und J. TRAVIS (1973 b)

Human sperm acrosomal proteinase: Antibody
inhibition and immunologic dissimilarity
to human pancreatic trypsin
Fert. Steril. 24: 479

ZANEVELD, L.J.D.; SCHUMACHER, G.F.B.; FRITZ, H.; FINK, E.
und E. JAUMANN (1973 c)

Interaction of human sperm acrosomal proteinase
with human seminal plasma proteinase inhibitors
J. Reprod. Fert. 32: 525

Außerdem wurde verwendet:

KLENNER, A. (1974)

Enzymatische und morphologische Auswirkung der
Tiefgefrierung auf das akrosomale System von
Eberspermien
(in Vorbereitung)

LEBENS LAUF

Am 8. September 1944 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Alfred Wendt und seiner Ehefrau Elisabeth Wendt, geb. Hanitsch, in Heilbronn am Neckar geboren. In Backnang besuchte ich die Grundschule und schloß am dortigen Gymnasium 1965 meine Schulzeit mit dem Abitur ab. Nach zweijähriger Dienstzeit bei der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1967 das Studium der Tiermedizin an der Tiermedizinischen Fakultät der Universität München. Im Oktober 1969 heiratete ich Fräulein Margot Kirsch. Unsere Tochter kam im Juni 1972 zur Welt. Nach Abschluß der tierärztlichen Prüfung wurde mir im Dezember 1972 die Bestallung als Tierarzt zuerkannt. Seit November desselben Jahres war ich an der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. W. LEIDL für die großzügige Unterstützung bei Anfertigung der Arbeit und die Überlassung des Themas herzlich danken.

Mein Dank gilt außerdem den Angehörigen der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München, besonders Herrn Dr. STOLLA, Herrn Dr. SCHEFELS und Frau HAITCHI, die mir in allen technischen Belangen bereitwillig zur Seite standen.

Herrn Dr. FRITZ am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München sowie Herrn Dr. SCHILL an der Dermatologischen Poliklinik der Universität München danke ich für ihre technische Hilfe im biochemischen Bereich.

